



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL**

**“Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas”**

*Miriam Cristina Díaz García*

Cartagena, 2012





# **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA**

## **DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL**

### **“Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas”**

Memoria presentada por Miriam Cristina Díaz García,  
Ingeniero Agrónomo, para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Politécnica de Cartagena

Dirigida por los Doctores:

José María Obón de Castro

M<sup>a</sup> Rosario Castellar Rodríguez

Cartagena, 2012







**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE  
TESIS DOCTORAL POR LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Rosario Castellar Rodríguez y D. José María Obón de Castro, Directores de la Tesis  
doctoral “Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas”

**INFORMAN:**

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D<sup>a</sup>. Miriam Cristina Díaz García,  
dando nuestra conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 18 de junio de 2012

LOS/LAS DIRECTORES/AS DE LA TESIS



Fdo.: M<sup>a</sup> Rosario Castellar Rodríguez José María Obón de Castro

**COMISIÓN DE DOCTORADO**





**CONFORMIDAD DE DEPOSITO DE TESIS DOCTORAL  
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D/D<sup>a</sup>. José Manuel Moreno Angosto, Secretario de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos.

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral titulada, "Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas", ha sido realizada por D<sup>a</sup>. Miriam Cristina Díaz García, bajo la dirección y supervisión de los Drs. M<sup>a</sup> Rosario Castellar Rodríguez y José María Obón de Castro, dando su conformidad a la misma la Comisión Académica, con la finalidad de que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 25 de junio de 2012

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA



Fdo: José Manuel Moreno Angosto

**COMISIÓN DE DOCTORADO**



**f SéNeCa<sup>(+)</sup>**

Agencia de Ciencia y Tecnología  
Región de Murcia



**Universidad  
Politécnica  
de Cartagena**



**J. GARCIA CARRION**  
Tradición y calidad desde 1890

Los trabajos realizados en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT en colaboración con la empresa J. García Carrión S.A. y financiados con los proyectos de la beca asociada a la realización de proyectos en I+D, innovación y transferencia de tecnología de la *Fundación Séneca*, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología (12610/BPS2/09, 16227/BPS/10 y 18476/BPS/11), han permitido analizar, identificar y cuantificar los compuestos funcionales de los zumos de frutas analizados en la presente Tesis. Estos análisis se han realizado mediante la separación, identificación y cuantificación de cada polifenol presente en el zumo con el empleo de técnicas de análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (UHPLC) para obtener el perfil de compuestos funcionales o “huella dactilar” en zumos de frutas rojas.



## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis los Doctores D. José María Obón de Castro y D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Rosario Castellar Rodríguez por hacer posible el desarrollo de mi trabajo de investigación, la confianza prestada, su dedicación, apoyo y amistad.

A la Fundación Séneca, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, por la beca concedida gracias a la cual he desarrollado el presente trabajo.

A mi tutor D. Juan Guardiola Ortuño de la empresa J. García Carrión S.A. por su apoyo y trabajo realizado durante esta etapa.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental y demás personal de la Universidad por sus ánimos y apoyo durante estos años.

A los miembros de la Asociación de Jóvenes Investigadores de Cartagena (AJICT) por invertir su tiempo en el bien común de los becarios de la UPCT.

A mi familia, amigos y todas aquellas personas que de una u otra manera han colaborado en el desarrollo de este trabajo.





## **Divulgación de resultados**

Los resultados obtenidos como parte de este trabajo de investigación han sido publicados en las siguientes revistas científicas y conferencias de ámbito nacional e internacional:

### **Revistas internacionales listadas en el Journal Citation Reports**

- Díaz-García, M.C.; Obón, J.M.; Castellar, M.R.; Collado, J. & Alacid, M. (2012) “Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices”. *Food Chemistry*. Enviado a publicación.
- Obón, J.M.; Díaz-García, M.C. & Castellar, M.R. (2011) “Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC”. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 760-771.

### **Revistas nacionales**

- Díaz-García, M.C.; Castellar, M.R. & Obón, J.M. (2012) “Determinación de polifenoles en smoothies”. *Revista de Introducción a la Investigación en la UPCT*, 5, 45-47.
- Díaz-García, M.C.; Obón, J.M. & Castellar, M.R. (2011) “Análisis composicional de polifenoles en el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus L. wild*)”. *Revista de Introducción a la Investigación en la UPCT*, 4, 48-50.
- Díaz-García, M.C.; Obón, J.M.; Lozano, M. & Castellar, M.R. (2010) “Beneficios para la salud de los frutos de *Opuntia spp.*” *Revista de Introducción a la Investigación en la UPCT*, 3, 15-17.

### **Congresos internacionales**

- **5th International Conference on Polyphenols and Health**. Sitges, Barcelona, España, 17-20 de octubre de 2011.  
“Quality and authenticity control of antioxidant fruit drinks made with red fruits, orange, banana and apple”. Participación: póster.  
Autores: M.C. Díaz-García; J.M. Obón; M.R. Castellar & M. Alacid.

- **9th International Food Data Conference.** Norwich, Reino Unido, 14-17 de septiembre de 2011.  
“Analysis of Total Individual Polyphenols (TIP) for labelling functional content of commercial antioxidant fruit juices with health claims”. Participación: póster.  
Autores: M.C. Díaz-García; M.R. Castellar & J.M. Obón.
- **9th International Food Data Conference.** Norwich, Reino Unido, 14-17 de septiembre de 2011.  
“Compositional analysis of bioactive compounds in four species of red prickly pears”. Participación: póster.  
Autores: M.R. Castellar; M.C. Díaz-García; J.M. Obón & M. Alacid.
- **ISE 2010. 11th Congress of the International Society of Ethnopharmacology.** Albacete, España, 20-25 de septiembre de 2010.  
“Medicinal properties of *Opuntia stricta* fruits”. Participación: póster.  
Autores: J.M. Obón; M.R. Castellar; M. Alacid & M.C. Díaz-García.
- **6th International Congress on Pigments in Food: Chemical, Biological and Technological Aspects.** Budapest, Hungría, 20-24 de junio de 2010.  
“Anthocyanin and betacyanin fingerprinting and detection of synthetic red pigments for red fruit juices quality and authenticity control”. Participación: ponencia oral.  
Autores: J.M. Obón; M.C. Díaz-García & M.R. Castellar.
- **16th IFU Congress "Bridging juice with science, health and technology".** Estambul, Turquía, 2-7 de mayo de 2010.  
“Determination of red fruit juices polyphenols profiles applying the IFU method nº 71 (anthocyanins analysis by HPLC)”. Participación: ponencia oral.  
Autores: M.R. Castellar; M.C. Díaz-García & J.M. Obón.

#### **Congresos nacionales**

- **VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.** Valencia, España, 8-10 de junio de 2011.  
“Optimización del análisis de antocianinas por HPLC a altas presiones”. Participación: ponencia oral.  
Autores: M.C. Díaz-García; J.M. Obón & M.R. Castellar.

## TESIS DOCTORAL:

### “Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas”

<b><u>RESUMEN</u></b> .....	1
<b><u>CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN</u></b> .....	5
<b>1.1.- LOS ZUMOS DE FRUTAS</b> .....	6
1.1.1.- Legislación y tipos de zumos .....	6
1.1.2.- Novedades de zumos en el mercado .....	11
1.1.2.1.- Los zumos AntiOx a base de frutas rojas.....	11
1.1.2.2.- Los smoothies, nuevas presentaciones de zumos y vegetales.....	12
1.1.3.- Comercialización de zumos de fruta.....	13
1.1.3.1.- Comercialización a nivel mundial .....	13
1.1.3.2.- Comercialización en la Unión Europea .....	14
1.1.3.3.- Comercialización en España .....	15
1.1.4.- Las frutas de los zumos mayoritariamente consumidos .....	16
1.1.4.1.- Naranja.....	17
1.1.4.2.- Manzana.....	18
1.1.4.3.- Plátano .....	19
1.1.5.- Las frutas de los zumos de frutas rojas .....	20
1.1.5.1.- Fresa.....	21
1.1.5.2.- Frambuesa.....	22
1.1.5.3.- Mirtilo .....	23
1.1.5.4.- Arándano.....	24
1.1.5.5.- Grosella negra .....	25
1.1.5.6.- Cereza .....	26
1.1.5.7.- Uva tinta.....	27
1.1.5.8.- Mora.....	28
1.1.5.9.- Zanahoria morada .....	29
1.1.5.10.- Higo chumbo de <i>Opuntia stricta</i> .....	30
<b>1.2. BENEFICIOS DE LOS ZUMOS DE FRUTAS</b> .....	31
1.2.1.- Los beneficios de los zumos en general.....	31
1.2.2.- Beneficios de los zumos de frutas rojas .....	33

<b>1.3.- LOS POLIFENOLES Y LAS BETALAINAS .....</b>	<b>37</b>
1.3.1.- Los polifenoles.....	37
1.3.1.1.- Ácidos fenólicos .....	38
a.1) Ácidos hidroxibenzoicos.....	38
a.2) Ácidos hidroxicinámicos .....	39
1.3.1.2.- Flavonoides.....	40
b.1) Chalconas.....	42
b.2) Flavonas.....	43
b.3) Flavanonas .....	44
b.4) Flavonoles.....	45
b.5) Isoflavonas.....	46
b.6) Flavan-3-oles .....	47
b.7) Antocianos .....	48
1.3.1.3.- Estilbenos.....	49
1.3.1.4.- Lignanós .....	50
1.3.2.- Las betalainas.....	51
<b>1.4.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES Y BETALAÍNAS EN ZUMOS DE FRUTAS.....</b>	<b>52</b>
1.4.1.- Análisis espectrofotométricos.....	53
1.4.2.- Análisis cromatográficos .....	55
1.4.3.- Análisis de polifenoles en zumos .....	62
1.4.4.- Bases de datos de la composición de alimentos .....	64
<b><u>CAPÍTULO 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</u></b>	<b>67</b>
<b>2.1.- JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.- OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>

<b><u>CAPÍTULO 3.- MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	75
<b>3.1- MATERIALES</b> .....	76
3.1.1.- Patrones de polifenoles .....	76
3.1.2.- Colorantes rojos alimentarios.....	78
3.1.3.- Zumos y smoothies de frutas .....	79
3.1.4.- Reactivos químicos .....	81
<b>3.2.- MÉTODOS</b> .....	82
3.2.1.- Método de obtención del zumo de <i>Opuntia stricta</i> .....	82
3.2.2.- Preparación de las muestras de zumos de frutas para su análisis.....	83
3.2.3.- Preparación de los smoothies para su análisis .....	84
3.2.4.- Preparación de los colorantes rojos para su análisis .....	84
3.2.5.- Preparación de patrones de polifenoles.....	85
3.2.6.- Método de hidrólisis ácida de ácidos hidroxycinámicos esterificados ....	86
3.2.7.- Determinación de pH .....	87
3.2.8.- Determinación de sólidos solubles totales .....	87
3.2.9.- Método de medida por espectrofotometría .....	87
3.2.10.- Método de medida de espectros de absorbancia .....	87
3.2.11.- Método de medida de espectros de fluorescencia.....	87
3.2.12.- Método IFU nº 71 de 1998.....	88
3.2.13.- Método UHPLC-PDA-Fluorescencia .....	90
3.2.14.- Método HPLC-MS-PDA.....	93
3.2.15.- Método de Folin-Ciocalteu .....	94
3.2.16.- Parámetros cromatográficos.....	95
 <b><u>CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	97
<b>4.1.- “Determinación del perfil de antocianos, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en zumos de frutas rojas por HPLC-PDA-FLUORESCENCIA”</b> .....	98
4.1.1.- Optimización de las condiciones de detección y análisis .....	99
4.1.2.- Perfil por HPLC de polifenoles en zumos de frutas rojas.....	110
4.1.3.- Perfil por HPLC de colorantes rojos alimentarios .....	181
4.1.4.- Recopilación de los datos de antocianos, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos identificados en las frutas rojas estudiadas.....	184

<b>4.2.- “Optimización de un método de análisis rápido por UHPLC para polifenoles”</b> .....	193
4.2.1.- Método UHPLC IFU. Optimización de la columna de análisis .....	194
4.2.2.- Nuevo método UHPLC con uso de ácido trifluoracético .....	198
4.2.3.- Comparación del método UHPLC IFU nº 71 con el método propuesto. .	203
<b>4.3.- “Determinación del perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de frutas por UHPLC-PDA-Fluorescencia”</b> .....	207
4.3.1.- Optimización de las condiciones de detección .....	207
4.3.2.- Identificación de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de fruta determinados por el método de UHPLC-PDA-Fluorescencia. ....	212
4.3.3.- Recopilación de los datos de ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos identificados en las frutas: naranja, manzana y plátano.....	247
4.3.4.- Recopilación de los datos de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas identificados en las frutas estudiadas.....	248
<b>4.4.- “Cuantificación de polifenoles totales en los zumos de frutas”</b> .....	251
4.4.1.- Cuantificación por UHPLC de polifenoles individuales en zumos de fruta	251
4.4.2.- Determinación de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu.....	259
4.4.3.- Correlación de los valores obtenidos con UHPLC y el método de Folin-Ciocalteu (TP <i>versus</i> TIP) para la determinación de los polifenoles totales de las frutas .....	261
<b>4.5.- “Análisis y cuantificación de fenoles totales en bebidas de frutas comerciales”</b> .....	263
4.5.1.- Zumos Antioxidantes .....	263
4.5.2.- Smoothies .....	281
 <b><u>CAPÍTULO 5.- CONCLUSIONES</u></b> .....	287
 <b><u>CAPÍTULO 6.- BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	293
 <b>Tabla de abreviaturas</b> .....	311



## Resumen

El mercado de zumos de frutas está despertando un gran interés comercial, desde el momento en el que el consumidor asocia un potencial beneficio para su salud por el consumo de estos zumos. Esto redunda en la necesidad de disponer de métodos analíticos que permitan controlar la calidad y autenticidad de estos zumos, que adquieren en el mercado mayores precios, y se encuentran sometidos a una mayor posibilidad de fraudes.

El presente trabajo ha sido planteado ante el interés de la industria de zumos de frutas por el control de calidad y autenticidad de los zumos de frutas rojas que se comercializan.

Los beneficios de las frutas, además de por sus componentes nutricionales, destacan por la presencia de polifenoles que se encuentran presentes en las frutas y vegetales procesados y, especialmente, en los zumos donde forman parte de los componentes bioactivos más importantes. El mejor aval científico de la actividad de los polifenoles viene dado por el efecto saludable en el estrés oxidativo y en las enfermedades cardiovasculares. Por este motivo, el mercado de los zumos de frutas despierta interés comercial ya que el consumidor asocia al consumo de los zumos un beneficio para su salud.

Varios son los objetivos propuestos en la presente memoria pero todos ellos se centran en el análisis de zumos de frutas por cromatografía líquida para conocer los diferentes perfiles de compuestos funcionales presentes en las frutas rojas. Los métodos de análisis permitirán autenticar el origen de un zumo o mezcla de zumos, además de mejorar la detección de las posibles adulteraciones que puedan producirse en la comercialización de estos zumos como por ejemplo la adición de colorantes o la mezcla con otros zumos de menor coste y/o calidad. Con los métodos de análisis desarrollados se podrá identificar y cuantificar los componentes de las frutas rojas que puedan tener efectos beneficiosos para la salud.

Además, el uso de un único método de análisis para el análisis del perfil de compuestos funcionales se trata de una herramienta útil para construir una base de datos de composición de polifenoles en alimentos.



**Summary**

Fruit juice market is waking up a great commercial interest because the consumer associates a potential benefit for his health with the consumption of these juices. Quality control and authenticity of these juices it is to acquire in the market higher prices, and they are subjected to a bigger possibility of frauds.

This Doctoral Thesis has been outlined in the interest of fruit juice industry by the quality control and authenticity of commercial red fruit juices.

Besides the general nutritional components in fruits, the presence of polyphenols is important in fruit and processed vegetables and, especially, in fruit juices. Fruit juices have a lot of bioactive components with health benefits. The scientific guarantee in polyphenol activity comes from the healthy effect in several illnesses like cardiovascular diseases. For this reason, the fruit juice market wakes up a commercial interest since the consumer it associates the juice consumption with health benefits.

Several are the objectives proposed in the present project, but all are centered in chromatography liquid analysis of fruit juices to know the different functional compounds profiles present in red fruits. Analyses methods will allow us to improve the detection of possible adulterations and take place in the commercialization of these juices. For instance food pigments addition or the mixture with other juices. Also, this method will allow us to identify and to quantify the principal components of red fruits that can suppose beneficial effects for consumer's health.

Besides, the use of a unique analysis method for polyphenol analysis is encouraged as a helpful tool to build up an unambiguous polyphenol composition database of foods





---

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1.- LOS ZUMOS DE FRUTAS

### 1.1.1.- Legislación y tipos de zumos

La FAO y la OMS crearon en 1962 un Código Alimentario (*Codex Alimentarius*) para facilitar el comercio internacional de alimentos y garantizar a los consumidores su calidad, seguridad e inocuidad. El código, ampliamente aceptado y adoptado, se ocupa de la protección del consumidor así como de la producción y comercio de los alimentos a escala mundial, nacional, regional y local. Uno de sus conceptos básicos es: “*Un alimento para ser nutritivo debe ser inocuo*”.

Las ventajas de su aplicación son las siguientes:

- Ayuda a que se cumpla el derecho fundamental de tener acceso a alimentos de buena calidad, inocuos y nutritivos.
- Elimina barreras no arancelarias y artificiales al comercio, lo que permite el acceso a los mercados a quienes producen, elaboran y comercializan los alimentos.
- Protege la salud de los consumidores.
- Hace que las reglas sean claras para todos, con lo que:
  - Facilita la comercialización y transporte de los alimentos.
  - Establece prácticas equitativas en el comercio de los alimentos.
  - Permite la normalización de conceptos y puntos de calidad.

Dentro de este Código Alimentario hay un código específico para Zumos (CODEX STAN 247-2005) que, conforme a las disposiciones de la Comisión del *Codex Alimentarius*, define lo que son los zumos y los métodos analíticos a utilizar para asegurar la calidad y autenticidad de los zumos ([www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org)).

La legislación de zumos vigente en la actualidad en la Unión Europea y en España está regulada por:

#### Disposición Comunitaria de directa aplicación:

- **Directiva 2001/112/CE** objeto de transposición del Consejo, de 20 de diciembre, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (Diario Oficial de la Unión Europea, L10 del 12.01.02).

- **Directiva 2009/106/CE** de la Comisión, de 14 de agosto, por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (Diario Oficial de la Unión Europea, L212 del 15.08.09).

Disposiciones Nacionales:

- ❖ **Real Decreto 1050/2003**, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares destinados a la alimentación humana (B.O.E. nº 184 del 02.08.03).
- ❖ **Real Decreto 1518/2007**, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables (B.O.E. nº 294 del 08.12.07).
- ❖ **Real Decreto 462/2011**, de 1 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana (B.O.E. nº 85 de 09.04.11).

Según el Código Alimentario de Zumos (CODEX STAN 247-2005) y el Real Decreto 1050/2003, se pueden definir los **tipos de zumos** que podemos encontrar en el mercado como:

- **Zumo de fruta:** líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha.
- **Zumo concentrado de fruta:** producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies, por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, dicha eliminación será de al menos un 50 %.
- **Zumo de fruta a base de concentrado:** producto obtenido mediante la incorporación al zumo de frutas concentrado de la cantidad de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y la restitución de los aromas, y en su caso, la pulpa y celdillas perdidas del zumo, pero recuperados en el proceso de producción del zumo de frutas de que se trate o de zumos de frutas de la misma

especie. El agua añadida deberá presentar las características adecuadas, especialmente desde el punto de vista químico, microbiológico y organoléptico, con el fin de garantizar las propiedades esenciales del zumo.

- **Zumo de fruta deshidratado o en polvo:** producto obtenido a partir de zumo de frutas, de una o varias especies, por eliminación física de la totalidad de agua.
- **Néctar de fruta:** producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel, a los productos de zumo definidos anteriormente y al puré de frutas o a una mezcla de estos productos. La adición de azúcares y/o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20 % del peso total del producto acabado.
- **Puré de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas:** producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos como el tamizado, triturado o desmenuzado de la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el zumo. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles; y podrá añadirse pulpa y celdillas obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.
- **Puré concentrado de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas:** producto obtenido mediante la eliminación física de agua del puré de fruta en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix en un 50 % más que el valor Brix establecido para el zumo reconstituido de la misma fruta. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y proceder del mismo tipo de fruta.

La elaboración de los zumos podrá realizarse junto con sus pepitas, semillas y pieles, que normalmente no se incorporan al zumo, aunque serán aceptables algunas partes o componentes de pepitas, semillas y pieles que no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación. Además, queda terminantemente prohibida la adición de **colorantes alimentarios** en la industria de zumos para enmascarar defectos del producto o para dar una sensación de calidad que éste no posee.

La legislación de colorantes alimentarios vigente en la actualidad en la Unión Europea y en España está regulada por:

Disposición Comunitaria de directa aplicación:

- ❖ **Directiva 94/36/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea, L237 del 10.09.94).
- ❖ **Directiva 2008/128/CE**, de la Comisión, por la que se establecen criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea, L6 del 10.01.09).
- ❖ **Reglamento (CE) 884/2007**, de la Comisión, relativo a las medidas de emergencia para la suspensión del uso de E-128 Rojo 2G como colorante alimentario (aplicable desde el 28 de julio de 2007) (Diario Oficial de la Unión Europea, L195 del 27.07.07).

Disposiciones Nacionales:

- ❖ **Real Decreto 1465/2009**, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios (B.O.E. nº 243 del 08.10.09).
  - Modificado por Orden SPI/1957/2011, por la que se modifica el Anexo del Real Decreto 1465/2009, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios (B.O.E. nº 169 del 15.07.11).
- ❖ **Real Decreto 2001/1995**, que aprueba la lista positiva de Aditivos Colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (B.O.E. nº 19 del 22.01.96)
  - Corrección de errores (B.O.E. nº 52 del 29.02.96)
  - Modificado por **Real Decreto 485/2001** (B.O.E. nº 122 del 22.05.01)

Según recoge el Real Decreto 2001/1995, se entiende por **colorantes alimentarios**:

- a) Aquellas sustancias que añaden o devuelven color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidos como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en alimentación.
- b) Los preparados obtenidos a partir de los alimentos y otras materias naturales obtenidas mediante extracción física o química que ocasione una selección de los pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos.

Los colorantes naturales se ven afectados por la luz, el calor, el pH, los agentes oxidantes y reductores y los periodos de almacenamiento. No sucede lo mismo con los colorantes artificiales, que son sustancias muy estables frente a la luz y el calor. Sobre su inocuidad, cabe señalar que, aunque muchos de ellos se utilicen desde hace décadas, todavía no se sabe lo suficiente sobre sus consecuencias en el ser humano. De hecho, muchos se estudian en la actualidad para conocer su efecto en la salud. Por ejemplo, como resultado de estos estudios, desde julio de 2007, el uso del colorante **E-128 Rojo 2G** como colorante alimentario está prohibido por la EFSA (The European Food Safety Authority) ([www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

Los colorantes se comercializan bien en forma de polvo seco o bien en fase líquida. Algunos colorantes se encuentran en las dos presentaciones, como es el caso de las betalaínas (E-162) que se obtienen principalmente de la remolacha roja, o el caramelo (E-150) que se obtiene calentando carbohidratos (Fernández-López *et al.*, 2002).

Los consumidores rechazan hoy en día la presencia de colorantes sintéticos en los alimentos y prefieren los colorantes naturales (Obón *et al.*, 2003), por este motivo, actualmente existe una cierta tendencia a utilizar, cuando es tecnológicamente factible, colorantes naturales en lugar de los sintéticos o artificiales ya que se cree que son inocuos y, por tanto, sin riesgo para la salud humana.

El uso de colorantes alimentarios en la elaboración de zumos de frutas, aun cuando estos sean naturales, debe ser objeto de control, e incluir un método analítico para su detección dentro del control de calidad de zumos.



### 1.1.2.- Novedades de zumos en el mercado

#### 1.1.2.1.- Los zumos AntiOx a base de frutas rojas

En los últimos años se han introducido gran variedad de zumos de frutas rojas en el mercado. Estos zumos, calificados como “Superzumos”, se pueden comercializar bien solos o en mezclas. Muchos de estos zumos son conocidos como “AntiOx” y contienen mezclas de zumos de frutas rojas con zumos de sabores tradicionales.

Los zumos de fruta deben su valor nutritivo principalmente a los azúcares aunque también son una importante fuente de minerales (potasio, calcio, magnesio, fósforo) y de antioxidantes (fundamentalmente la vitamina C y los compuestos fenólicos). Por tanto, los zumos de frutas son una alternativa muy útil para conseguir complementar las recomendaciones dietéticas del consumo diario de frutas y vegetales. Además, debido a que se les atribuyen propiedades funcionales por la presencia de compuestos antioxidantes, se están convirtiendo en productos muy aceptados por los consumidores.

En muchos de los casos estos zumos AntiOx vienen etiquetados con su contenido en polifenoles. Sirvan como ejemplo los productos de la marca Don Simón (J. García Carrión S.A.) que combinan sabores como piña, grosella, manzana y arándano (100 mg de compuestos fenólicos/100 mL), o bien naranja, mora, uva y frambuesa (95 mg de compuestos fenólicos/100 mL). Otras marcas como Minute Maid AntiOx (Coca-Cola Co.) combinan piña, grosella negra y ciruela (100 mg de compuestos fenólicos/100 mL), o bien sabores como naranja, frambuesa, zanahoria, acerola y grosella negra (80 mg de compuestos fenólicos/100 mL). Compal Vital AntiOx (Compal S.A.) combina fresa, mora, frambuesa, uva tinta y arándano (98 mg de compuestos fenólicos /100 mL). Pingo doce (Pingo 12. S.A) combina manzana, uva, fresa, frambuesa, arándano y grosella (83 mg de compuestos fenólicos /100 mL).

La Figura 1.1 muestra imágenes de diferentes anuncios de marcas comerciales de zumos AntiOx.



**Figura 1.1:** Ejemplos de diferentes zumos AntiOx.

### 1.1.2.2.- Los smoothies, nuevas presentaciones de zumos y vegetales

Los smoothies, elaborados con todo el fruto incluida su pulpa, han supuesto toda una revolución como bebidas saludables con propiedades funcionales. Una amplia variedad, sus propiedades nutritivas y un sabor único los diferencian de otros productos del mercado. Un estudio reciente sobre smoothies, realizado por Global Industry Analysts, indica que el mercado mundial de este tipo de bebidas para el año 2015 llegará a los 9 mil millones de dólares. Todo ello impulsado por las propiedades saludables de los smoothies y las campañas de marketing y desarrollo de nuevos productos en el mercado de bebidas ([www.smoothiecentral.com](http://www.smoothiecentral.com)).

Los smoothies son bebidas no alcohólicas que deben su nombre a la suavidad del producto resultante, diferenciándose del resto de productos del mismo sector por su cremosidad. Se caracterizan por tener una consistencia algo densa, parecida a un batido pero algo más espeso. Se trata de una alternativa energética y vitamínica frente a los refrescos. Este tipo de bebidas se elaboran a base de trozos de frutas naturales y zumos de fruta naturales o concentrados, incluyendo a veces algunos vegetales, mezclados con productos lácteos, hielo, helado, miel y trozos de fruta fresca entre otros ingredientes (Titus, 2008).



**Figura 1.2:** Varias marcas comerciales de smoothies.

Actualmente, en el mercado se pueden encontrar bajo la denominación genérica de smoothies, bebidas de concentrados de zumo, batidos de fruta, combinaciones de fruta y yogur, incluso helados con el reclamo de smoothies en sus envoltorios para hacer referencia a algo cremoso y frutal.

### **1.1.3.- Comercialización de zumos de fruta**

El consumidor puede encontrar en el mercado de los zumos de frutas diversos formatos como: zumos refrigerados o no, zumos obtenidos directamente de la fruta (exprimidos 100 %), zumos reconstituidos a partir de concentrados, mezclas de diversas frutas, néctares, refrescos sin gas, etc. Además, actualmente cabe destacar la presencia de otro tipo de producto como son los smoothies, valorados también por su contenido en compuestos funcionales.

Existen diversas asociaciones en la industria de zumos que regulan la calidad y especificaciones de los zumos y bebidas de frutas. A nivel internacional es la IFU (Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas), a nivel europeo es la AIJN (Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea) y en España es, desde 1978, ASOZUMOS (Asociación Española de Fabricantes de Zumos) la que integra la mayor parte de las empresas del sector, con una representatividad sectorial estimada en más del 80 % de la producción nacional de zumos y que engloba diversos modelos de negocio como transformadores de fruta, envasadores y comercializadores tanto de marcas propias como de marcas blancas. Además, de acuerdo con el modelo vigente en la mayoría de los países europeos, España cuenta con la Asociación Española para el Autocontrol de Zumos y Néctares (AEAZN) que se ocupa de fomentar la libre y leal competencia entre las empresas del sector mediante el control de la autenticidad y calidad de sus productos y lucha contra el fraude y la adulteración.

#### **1.1.3.1.- Comercialización a nivel mundial**

Según la AIJN el consumo mundial de zumos de frutas y néctares durante el año 2009 fue de 41 billones de litros, de los cuales, la Unión Europea consume 11,3 billones de litros correspondientes dos terceras partes (7,5 billones de litros) al consumo de zumos de frutas y un tercio a néctares (3,8 billones de litros) ([www.aijn.org](http://www.aijn.org)).

Los 10 principales países consumidores a nivel mundial de zumos y néctares son: Estados Unidos, Alemania, China, Rusia, Francia, Japón, Reino Unido, España, Canadá y Méjico, y suponen un 62 % del consumo total mundial. Cabe destacar la presencia de cuatro países europeos entre los diez mayores mercados de este tipo de bebida.

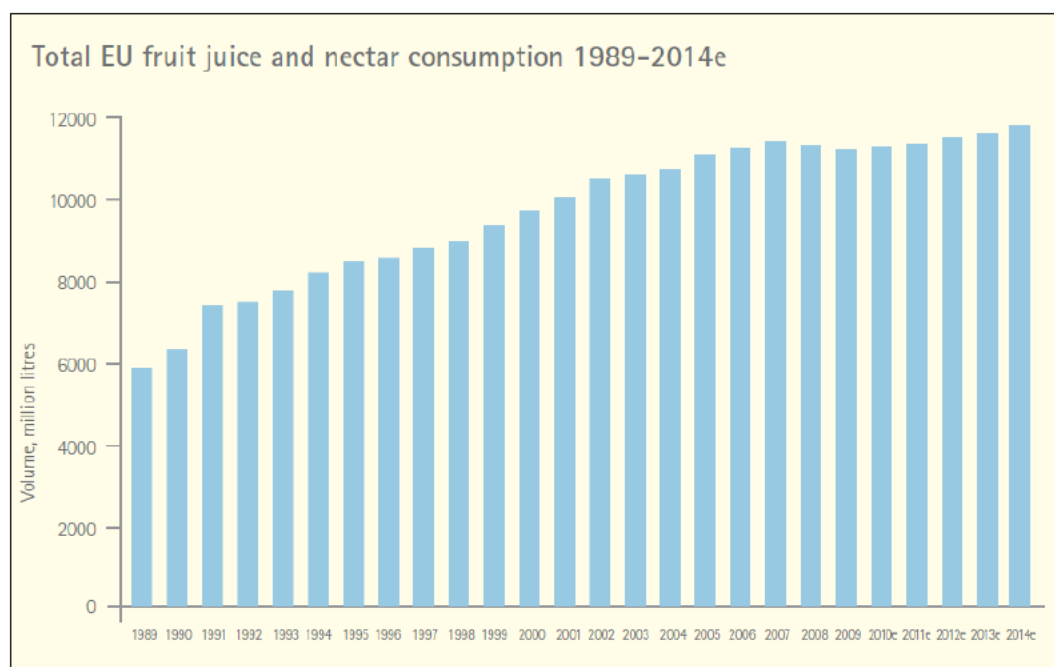
En cuanto al consumo per cápita, el mayor consumidor es Alemania (38,9 litros per cápita) seguido de Noruega (37,2 litros) y Chipre (36,6 litros).

### 1.1.3.2.- Comercialización en la Unión Europea

Los cinco principales países consumidores de zumos y néctares de la Unión Europea durante 2009 fueron: Alemania con un consumo de 3,193 billones de litros, líder absoluto con un 28,3 % del total consumido en la Unión Europea; Francia con una representación del 14,6 % (1,651 billones de litros), Reino Unido con un 12,7 % (1,435 billones de litros), España con 9,6 % (1,078 billones de litros) y Polonia con 6,6 % (749 billones de litros) ([www.aijn.org](http://www.aijn.org)).

Con respecto al consumo per cápita destaca Alemania como mayor consumidor con 38,9 litros, seguido de Chipre con 36,6 litros; Holanda con 29,1 litros; Estonia con 27,4 litros y Finlandia con 27,1 litros. España consume 24 litros per cápita, un valor superior a la media de la Unión Europea que se establece en 22,7 litros.

La Figura 1.3 muestra la evolución desde 1989 del consumo de zumos y néctares en la Unión Europea y la previsión estimada hasta 2014. La tendencia es a la estabilización de los mercados, tal y como se está cumpliendo desde el año 2005.



**Figura 1.3:** Evolución del consumo de zumos y néctares en la Unión Europea ([www.aijn.org](http://www.aijn.org))

### 1.1.3.3.- Comercialización en España

España ocupa el cuarto lugar en consumo de zumos y néctares de frutas, lo que supone un 9,6 % del mercado europeo. El consumo total en España durante el 2009 fue de 1078 millones de litros (Tabla 1.1) distribuidos en 702 millones de litros en zumos y 376 millones de litros de néctares ([www.aijn.org](http://www.aijn.org)).

En la Tabla 1.1 se muestra el volumen de zumos de frutas y néctares consumidos en España durante 2009, el cual fue ligeramente superior al de años anteriores suponiendo un aumento del 2,4 % en el consumo de zumos de frutas y del 0,8 % en el consumo de néctares respecto a la campaña de 2008. La Tabla 1.1 muestra además la procedencia y el modo de conservación del producto comercial. Debido al elevado consumo de estos productos, es importante conocer los métodos de control de calidad y autenticidad que eviten los posibles fraudes en este mercado.

**Tabla 1.1:** Evolución del consumo de zumos de frutas y néctares en España  
([www.asozumos.org](http://www.asozumos.org))

ZUMO DE FRUTAS (100%)						
Volumen, millones de litros	2005	2006	2007	2008	2009	% 08-09
Total Zumo de frutas	665	671	706	685	702	+2,4
Ambiente	634	631	658	637	655	+2,8
De concentrado	606	603	628	606	618	+1,9
Zumo exprimido	27	28	30	30	37	+22,5
Refrigerado	31	40	48	49	47	-3,1
De concentrado	13	16	18	17	15	-11,3
Zumo exprimido	18	24	29	30	30	+0,4
Smoothies	0	1	1	2	3	+10,9
NÉCTARES (25-99%)						
Volumen, millones de litros	2005	2006	2007	2008	2009	% 08-09
Total Néctares	349	355	363	373	376	+0,8
Ambiente	336	342	350	361	370	+2,6
Refrigerado	13	13	13	12	6	-50

Respecto a los zumos de frutas conservados a temperatura ambiente, destaca el consumo de los zumos procedentes de concentrado frente a los exprimidos, mientras que en zumos refrigerados ocurre al contrario. Cabe destacar un nuevo mercado en España y muy extendido en los Estados Unidos, los smoothies. En España, los smoothies comerciales todavía no están muy extendidos debido a la preferencia del consumidor por el consumo de fruta fresca, pero como se observa en la Tabla 1.1 el consumo de smoothies en nuestro país va en aumento. Un ejemplo es el aumento de 10,9 % en 2009 respecto al consumo en 2008.



En cuanto a néctares, la tendencia mayoritaria es el consumo de los almacenados a temperatura ambiente frente a los refrigerados.

#### **1.1.4.- Las frutas de los zumos mayoritariamente consumidos**

Los sabores más consumidos en la Unión Europea durante el año 2009 fueron naranja (33,8 %), manzana (14,9 %), mezclas (11,3 %), multivitaminas (6,6 %), piña (4,7 %) y otros (28,7 %).

Respecto a los sabores más consumidos en España, destacan la naranja (26,1 %), piña (24,6 %), melocotón (23,4 %) y uva (7,9 %). Estos sabores, a excepción de la naranja, son distintos a los mayoritariamente consumidos en el resto de Europa debido al excedente que tiene nuestro país en el cultivo de uva y melocotón que son sabores poco consumidos en otros países. El elevado consumo de piña y melocotón se debe a su dulzor, que atrae a los más pequeños, a diferencia del sabor de naranja que es consumido principalmente por adultos.

El plátano, cuarto cultivo de frutas más importante del mundo, se emplea en la fabricación de smoothies ya que esta fruta posee propiedades de textura, nutritivas y organolépticas que proporcionan al producto final la cremosidad que los caracteriza como smoothies.

Se describen a continuación las características de la naranja, manzana y plátano, que van a ser objeto de estudio en esta Tesis.



**Figura 1.4:** Frutas mayoritariamente consumidas.

#### 1.1.4.1.- Naranja (Orange)

La naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) es el fruto del naranjo dulce. Pertenecce al Género *Citrus* y es el más importante de la Familia de las Rutáceas que incluye más de 1.600 variedades.

Se trata de un fruto de forma esférica achatado por los polos con un diámetro de 6 a 10 centímetros y un peso que oscila de 150 a 200 gramos sin la piel. Se caracteriza por su color naranja en el flavedo (piel) provisto de vesículas oleosas. Su coloración la debe a la presencia de carotenos.

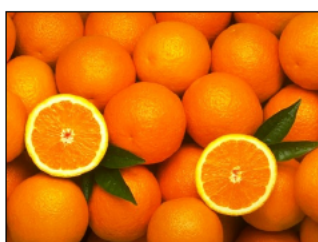


**Figura 1.5:** Naranjo.

Existen numerosas variedades de naranjas con particularidades en su sabor, jugosidad, tamaño, condiciones de cultivo y productividad diferentes. Esto permite que se pueda elegir el tipo más adecuado para cada uso concreto; bien sea para su consumo como fruta fresca, zumo, fabricación de derivados, etc.

El naranjo dulce procede de la zona sureste de China y del archipiélago malayo, y su cultivo se expandió por todo Oriente a través de la Ruta de la Seda. Los árabes introdujeron el naranjo dulce en Europa por el sur de España en el siglo X y, posteriormente se extendió a los Estados Unidos, Sudamérica, Sudáfrica y Australia (Martínez Febrer, 1983).

Actualmente, el naranjo es uno de los frutales más extendidos por todo el mundo, siendo los principales países productores: Brasil, Estados Unidos, España (zonas de Valencia, Murcia, Sevilla y Huelva), Italia, México, India, China, Israel, Argentina y Chile.



**Figura 1.6:** Frutos del naranjo y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El valor nutricional de la naranja se caracteriza por ser un fruto muy abundante en vitamina C, flavonoides, fibra, agua, minerales como el potasio, el magnesio y calcio, y aceites esenciales presentes en su piel.

Para la industria de producción de zumos la naranja se comercializa en forma de zumo y de zumo concentrado.

#### 1.1.4.2.- Manzana (Apple)

La manzana (*Malus domestica* Borkh.) es el fruto del manzano, árbol que pertenece a la Familia de las Rosáceas. Es considerado como el árbol frutal más cultivado a nivel mundial.

Las manzanas son pomos de forma ovoide de piel lisa y brillante con pepitas de color pardo en su interior. Las más comercializadas son aquellas cuyo calibre oscila entre 75 a 85 milímetros y con un peso de 170 a 250 gramos. Los diferentes colores de la piel hacen que se diferencien cuatro grupos: verdes, rojas, amarillas y bicolors. La pulpa puede ser dura o blanda y su sabor va desde el muy dulce al muy ácido.



**Figura 1.7:** Manzano.

Se desconoce el origen exacto del manzano, unos autores señalan que procede de las montañas del Cáucaso, mientras que otros indican que procede de las regiones montañosas de Asia central. La manzana fue introducida en la península ibérica por los romanos y árabes y, en el siglo XVI, los conquistadores españoles extendieron su cultivo al nuevo mundo (Coque Fuertes, 2006).

Actualmente España es uno de los principales países productores destacando las zonas de Cataluña, Aragón, La Rioja y Navarra. Otros países productores son: Estados Unidos, Brasil, México, Alemania, Italia, Polonia, Francia, India, Rusia y China. La facilidad de adaptación de este árbol a diferentes climas y suelos permite cultivarlo a gran escala en países de clima relativamente frío.



**Figura 1.8:** Frutos del manzano y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

Desde el punto de vista nutricional, la manzana es una de las frutas más completas, contiene fibra, azúcares y vitaminas C y E.

En el área comercial de los productores de zumos la manzana se encuentra en forma de zumo y de zumo concentrado.



### 1.1.4.3.- Plátano (Banana)

El plátano (*Musa cavendishii* L.) es el fruto de la platanera. Pertenecce a la Familia de las Musáceas, la cual incluye los plátanos comestibles crudos, los plátanos enanos y los plátanos machos.

Los plátanos se caracterizan por tener una forma oblonga, alargada y algo curvada. El peso del plátano macho es de los más grandes (200 gramos), mientras que el del plátano enano (100-120 gramos) es mucho más pequeño que el resto. Su color varía en función de la variedad, la piel puede ser de color verdoso, amarillo o amarillo-rojizo. Su pulpa es harinosa y su sabor es dulce, intenso y perfumado (Galán Sauco, 1992).



**Figura 1.9:** Platanera.

El plátano tiene su origen en Asia meridional y se conoce en la zona del Mediterráneo desde el año 650 d.C. La especie llegó a las Islas Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevada a América. El plátano macho y el enano son propios del Sudoeste Asiático aunque su cultivo se ha extendido a Centroamérica y Sudamérica. También se cultiva en la mitad sur de África y en Asia meridional.

El plátano es el cuarto cultivo de frutas más importante del mundo. Los países latinoamericanos y del Caribe producen el grueso de los plátanos del comercio internacional, unos 10 millones de toneladas, del total mundial (12 millones). Para la industria de zumos el plátano se comercializa en forma de puré y néctar.

En España el plátano se cultiva en las Islas Canarias, y son considerados como una fruta con excelentes cualidades de conservación, que se pueden cultivar en un clima típicamente subtropical.



**Figura 1.10:** Frutos de la platanera y distribución geográfica mundial del cultivo.

([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

Desde el punto de vista nutricional, el plátano destaca por su contenido en hidratos de carbono, potasio, magnesio, ácido fólico y el elevado aporte de fibra.

### 1.1.5.- Las frutas de los zumos de frutas rojas

El mercado de zumos de frutas rojas está despertando un gran interés comercial, desde el momento en el que el consumidor asocia un beneficio potencial para su salud por el consumo de estos zumos. Por lo que se califican como compuestos funcionales que contribuyen a la buena salud del consumidor.

Son muchas las frutas con pigmentos rojos de las que se pueden obtener zumos con estas propiedades saludables. En la Figura 1.11 se muestran algunos ejemplos de estos zumos.

En este trabajo se van a estudiar once zumos de frutas rojas:

- |               |                        |               |                             |
|---------------|------------------------|---------------|-----------------------------|
| 1.- Fresa     | 4.- Arándano europeo   | 7.- Cereza    | 10.- Zanahoria morada       |
| 2.- Frambuesa | 5.- Arándano americano | 8.- Uva tinta | 11.- <i>Opuntia stricta</i> |
| 3.- Mirtilo   | 6.- Grosella negra     | 9.- Mora      |                             |

Las nueve primeras son zumos rojos mayoritariamente consumidos. La zanahoria morada, aunque no es un fruto se adiciona a algunas mezclas de frutos rojos por su alto contenido en antocianos responsables del color. Respecto al fruto de *Opuntia stricta* no es un fruto comercial, pero es fuente potencial de colorante rojo natural E-162 y rico en compuestos funcionales, por ello se ha incluido en el presente estudio.

Los pigmentos rojos que aparecen en las frutas rojas pertenecen a dos familias de compuestos químicos, las antocianinas y las betacianinas, ambas con propiedades antioxidantes. De las diez frutas rojas descritas a continuación las nueve primeras deben su color rojo a la presencia de antocianinas y la última (*Opuntia stricta*) a las betalainas.



**Figura 1.11:** Diferentes zumos de frutas rojas que hay en el mercado.

### 1.1.5.1.- Fresa (Strawberry)

Las fresas (*Fragaria x Ananassa* Duchesne) crecen en la planta del fresal que pertenece a la Familia de las Rosáceas. Se trata de una planta rastrera que, aunque crece de forma silvestre en los bosques, su cultivo está muy extendido.

Esta fruta se caracteriza por tener forma cónica casi redonda. Su carne, de color es rojo brillante, es perfumada, jugosa y mantecosa, con un sabor que varía de ácido a muy dulce. Lo que más caracteriza a esta fruta es su intenso aroma (Branzanti, 1989).



**Figura 1.12:** Fresal.

La fresa que se consume en Europa es americana y fue introducida en Europa por los primeros colonos de Virginia (Estados Unidos).

En España, la provincia de Huelva es la más especializada en el cultivo de fresas y fresones con una producción que representa más del 65 % del volumen nacional. También destaca su cultivo en la comarca del Maresme en Barcelona, Valencia y Extremadura. Otros países productores son Italia, Israel y los Estados Unidos.



**Figura 1.13:** Frutos de la fresa y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

Las fresas aportan fibra y tiene como hidratos de carbono fructosa, glucosa y xilitol. En lo que se refiere a otros nutrientes, las fresas son una buena fuente de vitamina C, de ácido cítrico, ácido salicílico que tiene acción antiinflamatoria, analgésica y anticoagulante, y de flavonoides.

En la industria de zumos la fresa se comercializa en forma de puré para elaborar las mezclas de zumos de fruta.



### 1.1.5.2.- Frambuesa (Raspberry)

La frambuesa (*Rubus idaeus L.*), conocida también como fresa del bosque, es el fruto del frambueso, planta que crece silvestre en todos los países de clima templado. Perteneciente a la Familia de las Rosáceas.

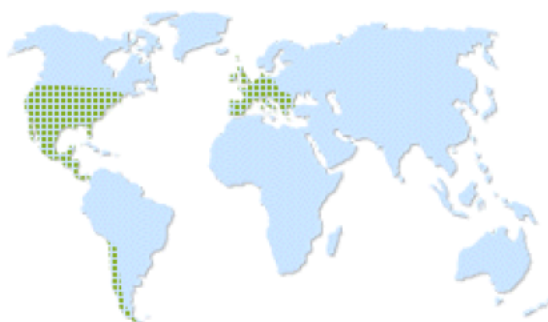
La frambuesa es una baya pequeña de forma redonda o cónica. Está formada por muchas drupas dispuestas en piña y tiene un tamaño de 15 a 20 mm de diámetro. Su piel es aterciopelada, de color rojo escarlata y está cubierta de un fino vello perceptible cuando es degustada. La pulpa es carnosa, jugosa y alberga en su interior diminutas semillas. Su sabor es agri dulce y muy aromático (Salunkhe & Kadam, 1995).



**Figura 1.14** Frambueso.

El frambueso rojo o europeo es originario del monte Ida, en Grecia, desde donde se extendió a Italia, Países Bajos, Europa central, Inglaterra y posteriormente a América central, América del Norte y Chile.

En España son zonas productoras de frambuesa Huelva, Asturias, Cáceres y la comarca del Maresme en Barcelona, aunque el mercado español se nutre también de las importaciones realizadas desde Chile y Centroamérica (www.consumer.es).



**Figura 1.15:** Frutos del frambueso y distribución geográfica mundial de su cultivo.  
(www.consumer.es)

El valor nutricional de las frambuesas se caracteriza por aportar fibra, ser fuente de vitamina C, ácido cítrico y eláxico, y minerales como el potasio, magnesio y calcio.

Para la industria zumos la frambuesa se comercializa en forma de puré para elaborar las mezclas de zumos de fruta.

### 1.1.5.3.- Mirtilo (Blueberry)

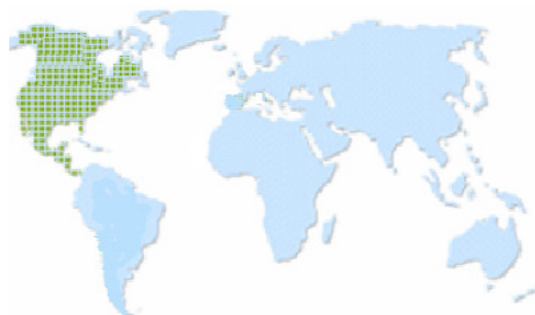
El mirtilo (*Vaccinium myrtillus L. wild*) pertenece a la Familia de las Ericáceas. Crece como un arbusto pequeño, de ramas leñosas y hojas con borde aserrado. Sus flores tienen la corola de color rosado.

Los frutos son bayas redondeadas de color negro azulado que contiene pequeñas semillas. Su consistencia es suave y su sabor es muy astringente (Salunkhe & Kadam, 1995).



**Figura 1.16:** Mirtilo.

Esta especie es nativa de los Estados Unidos. Actualmente, este país junto con Canadá son los exportadores líderes mundiales con un 90 % de la producción total mundial. En verano abunda en lugares boscosos de Europa.



**Figura 1.17:** Frutos del mirtilo y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El mirtilo tiene una gran capacidad antioxidante respecto a otras frutas frescas debido a su alto contenido en antocianinas, que le dan su color azul luminoso característico. También tiene otros compuestos característicos como la cera epicuticular que tiene en su superficie.

En cuanto a sus propiedades, el mirtilo contiene fibra, aporta vitaminas A y C, hierro y potasio y un alto contenido en antioxidantes.

Dentro del mercado de la industria de zumos se encuentra en forma de zumo y de zumo concentrado.

#### 1.1.5.4.- Arándano (Cranberry)

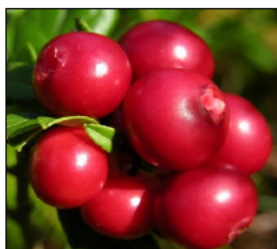
El arándano (*Vaccinium oxycoccus L.*) es un pequeño arbusto de 25-50 cm de altura y 1,5 cm de diámetro. Pertenece a la Familia de las Ericáceas.

El fruto del arándano es una baya pequeña de forma esférica, redonda u oval caracterizada por tener el cáliz en forma de estrella. Su tamaño es parecido al de una aceituna (entre 7 y 12 mm de diámetro), con la piel tersa y la pulpa jugosa. Su color es rojo intenso o negro y suele aparecer cubierto por un polvillo azulado o una película resistente brillante. Destaca por su sabor agri dulce y acidulado.



**Fig 1.18:** Arándano europeo.

Estos frutos son originarios de Asia y Europa. En el presente trabajo hemos estudiado ambos. Actualmente, las mayores producciones de arándano en Europa se dan en Alemania, Francia y Polonia; en Estados Unidos se cultivan en Michigan, New Jersey y Carolina del Norte; y, en el hemisferio sur, destacan Chile, Australia y Nueva Zelanda ([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)).



**Figura 1.19:** Frutos del arándano y la distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El arándano destaca por sus cualidades antioxidantes, nutritivas y medicinales, siendo clasificado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en la posición número uno de frutos y vegetales por su capacidad antioxidante.

Para la industria de producción de zumos el arándano se encuentra en el mercado en forma de zumo y de zumo concentrado.

### 1.1.5.5.- Grosella negra (Blackcurrant)

La grosella negra (*Ribes nigrum* L.) es el fruto del grosellero. Se trata de un arbusto frondoso de la Familia de las Grosulariaceas que puede llegar a los 2 m de altura. Crece en forma de pequeños racimos similares a las uvas pero de tamaño muy inferior.

La baya es redonda y globosa con un tamaño de 7 a 10 mm de diámetro. Su color va en función de la variedad. Destaca por su pulpa carnosa y jugosa y está llena de semillas diminutas. Su sabor es amargo y muy ácido.



**Figura 1.20:** Grosellero.

Estas frutas son originarias de las regiones boscosas euroasiáticas. Actualmente, se cultivan especies con fines comerciales, por lo que es fácil encontrarlas en mercados especializados. Los países productores de grosella negra más importantes son: Italia, Bélgica, Holanda e Inglaterra (Navindra, 2008).



**Figura 1.21:** Frutos del grosellero y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El valor nutricional de la grosella negra destaca por contener mucha fibra y no tiene casi calorías por su escaso aporte de hidratos de carbono. Son especialmente ricas en vitamina C.

Se comercializa en forma de zumo y de zumo concentrado como materia prima para las industrias de zumos y bebidas de fruta.



#### 1.1.5.6.- Cereza (Sour cherry)

El cerezo (*Prunus cerasus* L.) es un árbol frutal que pertenece a la Familia de las Rosáceas y que puede llegar a alcanzar los 10 m de altura. Sus frutos, las cerezas, son drupas de forma redondeada, globosa o con figura de corazón. Poseen un hueso globoso y casi liso. Su tamaño comercial está entre los 13 y 20 mm, con un diámetro de unos 2 cm y un peso de 6 a 9 g. Su color varía en función de la variedad, siendo entre el morado oscuro casi negro y el rojo. Destaca por su sabor dulce y jugoso o agrio.



**Figura 1.22:** Cerezo.

El origen de esta fruta se sitúa en el mar Negro y en el mar Caspio, difundiéndose después hacia Europa y Asia, por medio de las aves y las migraciones humanas. En la actualidad, el cerezo se cultiva en numerosas regiones y países del mundo con clima templado, destacando Rusia, Estados Unidos, Alemania, Italia, Francia y España.

En nuestro país, el valle del Jerte en Cáceres, es un área de producción tradicional aunque el valle del Ebro y la comunidad andaluza están aumentando de forma notable su producción (Feucht, 2008).



**Figura 1.23:** Frutos del cerezo y la distribución geográfica mundial del cultivo.

([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El valor nutricional de la cereza se caracteriza por ser rica en hidratos de carbono, sobre todo en fructosa, aporta fibra y pequeñas cantidades de provitamina A y de vitamina C.

La cereza se presenta en forma de zumo y de zumo concentrado para la industria de zumos.



### 1.1.5.7.- Uva tinta (Black grape)

La uva (*Vitis vinifera L.*) es el fruto de la vid y crece en forma de racimos. Pertenece a la Familia de las Vitáceas que incluye unas 600 especies de arbustos.

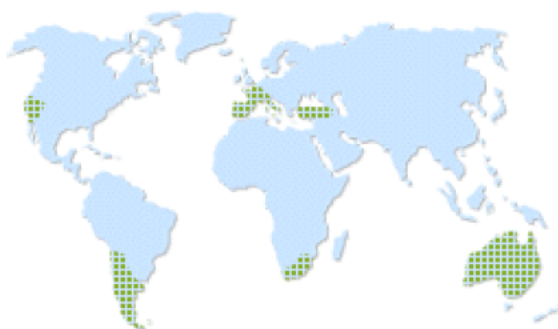
Los frutos son bayas carnosas y nacen apiñadas en largos racimos compuestos por granos redondos o alargados de 1,6 cm de diámetro y un peso 200 a 350 mg. El color de la piel es rojizo o púrpúreo dependiendo de las variedades. Su pulpa es jugosa y dulzona (Ribereau-Gayon, *et al.* 2003).



**Figura 1.24:** Vid.

Los botánicos sitúan el origen de la uva cultivada en Europa en la región asiática del mar Caspio, desde donde las semillas se dispersaron hacia el oeste por toda la cuenca mediterránea. Fueron los colonos españoles los que introdujeron la vid en América del Norte.

Actualmente la vid se cultiva en las regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores: Australia, Sudáfrica, Europa (Italia, Francia, España, Portugal, Turquía y Grecia) y en el continente americano (California, Chile y Argentina).



**Figura 1.25:** Racimo de uva tinta y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

El valor nutricional de la uva tinta se caracteriza por la presencia de azúcares (glucosa y fructosa), vitaminas (ácido fólico y vitamina B6), minerales (potasio, magnesio y calcio), antocianos y flavonoides.

Para la industria de producción de zumos la uva se comercializa en forma de zumo y de zumo concentrado.

#### 1.1.5.8.- Mora (Blackberry)

La mora (*Rubus fruticosus L.*), también denominada frambuesa negra, es un fruto que crece en arbustos de la Familia de las Rosáceas.

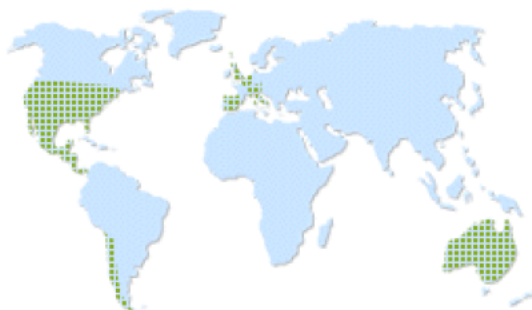
Se trata de un fruto de pequeño tamaño, redondo o ligeramente alargado, compuesto por pequeñas drupas que se agrupan entre sí y que contienen en su interior una semilla diminuta. Tiene una longitud de 1,5 a 2 cm. Su color es negro brillante intenso. Su sabor es dulce cuando está bien madura con matices ácidos ([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)).



**Figura 1.26:** Moral.

Estas frutas son originarias de Asia y Europa aunque actualmente se cultivan en Estados Unidos, Chile, Australia y Europa. Crecen silvestres en muchas zonas como llanuras, montañas, claros de bosques y sobre todo en pendientes y márgenes soleados.

Existen más de 300 híbridos de mora, aunque sólo nueve tienen valor comercial. Los tres híbridos más comerciales son cruces entre mora y frambuesa: Logan (cruce entre una zarzamora y una frambuesa), Young (cruce entre una zarza de los rastrojos y una frambuesa) y Boysen (cruce entre la variedad Young y la frambuesa).



**Figura 1.27:** Frutas del moral y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso aporte de hidratos de carbono. Son especialmente ricas en vitamina C, fibra, potasio, hierro y calcio.

Se presentan en forma de puré para elaborar las mezclas de zumos de fruta.

### 1.1.5.9.- Zanahoria morada (Purple carrot)

Aunque la zanahoria no sea una fruta, se ha incluido en este estudio porque se utiliza como ingrediente en zumos y néctares producidos a partir de mezclas de diferentes frutas rojas.

La zanahoria morada (*Daucus carota L.*) pertenece a la Familia de las Umbelíferas y es una de las hortalizas de mayor consumo.

La zanahoria morada tiene hojas de color verde oscuro intenso, un poco más grande que la zanahoria tipo Nantes (de color naranja). Su raíz termina en punta. Su color es morado debido al su alto contenido en antocianos, y palidece hacia el centro de la raíz hasta llegar a un tono casi blanco. Su sabor es ligeramente dulce.



**Fig 1.28:** Zanahoria morada.

La zanahoria tiene su origen en el este del mediterráneo y sudoeste de Asia, aunque los historiadores lo ubican en la zona de Afganistán debido a la gran variedad existente en dicho país.

La zanahoria fue introducida en España por los árabes desde el norte de África, y desde aquí, hasta Holanda y el resto de Europa. Actualmente, se cultiva en España en la sierra gaditana y en el sur de Andalucía (Khandarea *et al*, 2011).



**Figura 1.29** Zanahoria morada y distribución geográfica mundial del cultivo.  
([www.consumer.es](http://www.consumer.es))

La zanahoria es un alimento excelente desde el punto de vista nutricional gracias a su contenido en vitaminas y minerales.

Se comercializa para su uso industrial en forma de zumo concentrado.



#### 1.1.5.10.- Higo chumbo de *Opuntia stricta* (Prickly pear)

*Opuntia stricta* Haw. pertenece al género *Opuntia*, del que existen aproximadamente 200 especies (The new Cactus Lexicon, 2006). Pertenece a la Familia de las Cactáceas y al Orden *Caryophyllales*.

Se trata de un cactus que puede alcanzar los 2 m de altura. Produce frutos piriformes de pequeño tamaño con flores vistosas de color amarillo. El fruto tiene espinas finas y frágiles de 2 a 3 mm de longitud, es de color morado y su interior es morado intenso. Es de sabor muy ácido y su pulpa es gelatinosa y con pocas semillas.



Fig. 1.30: *Opuntia stricta*.

Originario del continente americano, las plantas del género *Opuntia* crecen en las zonas áridas y semiáridas desde el norte de los Estados Unidos hasta la Patagonia. La chumbera (*Opuntia ficus-indica*) fue introducida en Europa por los conquistadores españoles y distribuida hacia otros países del mundo. Los principales productores mundiales de higos chumbos comerciales son México, Italia, España, Chile, Israel, Brasil y Sudáfrica (Cerezal & Duarte, 2004). En total existen alrededor de 100.000 hectáreas de plantaciones comerciales de *Opuntia* a nivel mundial, de las cuales, el 70 % se encuentran en México (Esquivel, 2004). En España este cultivo fue introducido por las Cortes de Cádiz en las Islas Canarias (Díaz Medina *et al.*, 2007) para obtener el colorante natural rojo cochinilla, que es producido por el insecto *Dactylopius coccus* Costa, parásito de las chumberas. Destaca su cultivo en el nordeste de la Península Ibérica, Islas Canarias y en el sureste (zonas de Valencia y Murcia).



Figura 1.31: *Opuntia stricta* y distribución geográfica mundial del cultivo.

El fruto de *Opuntia stricta* destaca por ser una fuente alternativa a la remolacha para obtener el colorante betalaínico comercial E-162. Actualmente no existe una forma comercial de este zumo (Castellar *et al.*, 2003).

## 1.2. BENEFICIOS DE LOS ZUMOS DE FRUTAS

### 1.2.1.- Beneficios de los zumos en general

Las plantas forman parte de la dieta humana y contienen componentes bioactivos que pueden ejercer efectos fisiológicos más allá de la nutrición promoviendo la salud humana y siendo beneficiosos. Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo regular de frutas y vegetales está asociado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, problemas cardiovasculares, Alzheimer, derrame cerebral, cataratas o el empeoramiento funcional asociado a la edad (Schieber *et al.* 2001; Stintzing & Carle, 2004). Los zumos son una fuente importante de vitaminas y minerales y con su consumo podemos obtener diversos nutrientes y compuestos funcionales necesarios para nuestro organismo.



**Figura 1.32:** Zumo de frutas.

Una estrategia nutricional surgida hace pocos años es la denominada **zumoterapia**. Básicamente se trata de consumir las frutas en forma de zumo y no crudas buscando la máxima asimilación o disponibilidad de la gran cantidad de vitaminas y minerales que aportan las frutas y verduras.

Los componentes que nos aporta el consumo de frutas en general y que son beneficiosos para la salud de los consumidores, se pueden clasificar en:

- Agua: en general todas las frutas tienen un alto porcentaje en torno al 90 %.
- Vitaminas: las frutas son ricas en vitaminas C, ácido fólico, vitamina B6...
- Sales minerales: potasio, magnesio y calcio.
- Hidratos de carbono: glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol.
- Fibra (mejora el tránsito intestinal).
- Ácidos orgánicos: ácido cítrico (acción desinfectante), málico, oxálico y salicílico (acción analgésica, anticoagulante y antiinflamatoria).

Los polifenoles tienen un papel beneficioso para nuestra salud debido al efecto antioxidante que proporcionan, que previene el envejecimiento celular. Las frutas constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. La mayoría de estos compuestos permanecen en los productos elaborados a base de frutas como por ejemplo zumos o mermeladas (García-Alonso, 2005).

El aporte de polifenoles en la dieta puede estar entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas.

La AIJN (Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea) atribuye numerosos beneficios para la salud a los **polifenoles** que contienen las frutas. En principio, los polifenoles son absorbidos y metabolizados en el organismo, conservando sus propiedades antioxidantes.

Entre los numerosos beneficios para la salud que se atribuyen a los polifenoles presentes en los zumos de frutas, un informe del Instituto Pasteur para la AIJN (Lecerf, 2006) y el estudio de De Pascual-Teresa & Sánchez-Ballesta (2008) destacan:

- **Propiedades cardiovasculares:** la comunidad científica ha demostrado que la ingesta de una alta cantidad de polifenoles tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación sanguínea e impidiendo la formación de trombos en los vasos sanguíneos. Estas propiedades se atribuyen fundamentalmente al flavonoide quercetina.
- **Propiedades anticancerígenas:** diversos estudios han demostrado que muchos polifenoles, especialmente flavonoides, inhiben la iniciación, promoción y progresión de células cancerosas y por consiguiente de tumores.
- **Previenen la fragilidad del sistema vascular capilar y venoso:** aumentan la resistencia y disminuyen la fragilidad capilar favoreciendo el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir hemorragias. Los polifenoles con mejores resultados en este campo son flavonoides.
- **Antiinflamatorios y analgésicos:** polifenoles como la hesperidina se emplean en el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos, grupo de los flavonoides, tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides.
- **Propiedades antimicrobianas:** la comunidad científica ha demostrado que polifenoles del tipo de los isoflavonoides y estilbenos poseen propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

- **Propiedades antioxidantes:** en las plantas los polifenoles pertenecientes al grupo de los flavonoides actúan como antioxidantes. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres.
- **Disminución del colesterol:** los polifenoles poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos en sangre. La ingesta de zumo de uva tinta concentrado incrementa la capacidad antioxidante y protege de la oxidación del colesterol LDL produciendo beneficios.
- **Propiedades gástricas:** relacionadas con las propiedades antiinflamatorias ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, protegen la mucosa gástrica previniendo la formación de úlceras. También se puede citar el caso de la cianidina (antocianina) que protege los daños gástricos de la mucosa causados por la ingesta de aspirina.
- **Propiedades para retrasar enfermedades neurodegenerativas:** algunos estudios han comprobado que el consumo de frutas y verduras, con alta concentración de polifenoles, disminuye el riesgo de incidencia de enfermedad de Alzheimer (Lee, 2005).

### 1.2.2.- Beneficios de los zumos de frutas rojas

Además de todos los componentes principales de las frutas en general, los **zumos de frutas rojas** destacan de forma especial por los beneficios que muestran para la salud sus compuestos rojos. El color rojo de las frutas rojas es debido a la presencia de pigmentos específicos. El color rojo de las frutas no solo depende de la especie, sino también de la variedad y está ligado al índice de maduración de los órganos vegetales, a la presencia de impurezas, a la realización apropiada o defectuosa de un tratamiento tecnológico, a las malas condiciones de almacenamiento, al comienzo de una alteración por microorganismos, etc. Así, la recolección en el momento apropiado y el tratamiento posterior del fruto, son importantes para mantener los niveles de estos compuestos en las frutas y en los productos elaborados.

Dependiendo del tipo de fruto rojo podremos encontrar diferentes compuestos responsables de su coloración roja. Los compuestos rojos solubles en agua pueden clasificarse en dos grandes grupos: las **antocianinas** y las **betacianinas**. El interés general de la industria alimentaria se centra en los zumos de frutas rojas con antocianinas, que son más abundantes en la naturaleza y los mayoritariamente consumidos. Los antocianos son los responsables de la coloración rojo-azulada de la mayoría de frutas y vegetales. Su interés se centra en su aplicación en la industria de colorantes alimentarios naturales y su aplicación en el campo de la salud humana. (De Pascual-Teresa & Sánchez-Ballesta, 2008)

La fuente mayoritaria de antocianinas son frutos como el mirtilo, la cereza, la frambuesa, la fresa, la grosella, o la uva tinta. Así, 100 g de estas frutas rojas pueden aportar hasta 500 mg de antocianinas.

La Figura 1.33 muestra algunos ejemplos de frutos rojos que deben su coloración a la presencia de antocianos. Las betacianinas tienen una distribución más restringida que las antocianinas y aparecen en variedades rojas de higo chumbo, pitaya y remolacha, tal y como se muestra en la Figura 1.34.



**Figura 1.33:** Mirtito, arándano, fresa, cereza y granada, ejemplos de frutas que deben su coloración a los antocianos.



**Figura 1.34:** Remolacha, *Opuntia stricta* y pitaya, ejemplos de frutas que deben su coloración a las betacianinas.



### - Beneficios de frutos con antocianos

Estudios recientes muestran que las **antocianinas** poseen un gran número de actividades biológicas incluyendo actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, mejora de la visión, inducen la apoptosis de las células, o muestran efectos neuroprotectores (Katsube *et al.*, 2003; Mazza, 2007; Wang & Stoner, 2008). Además, las antocianinas tienen variedad de efectos sobre los vasos sanguíneos, plaquetas, y pueden reducir el riesgo de infarto cardiaco (Burns *et al.*, 2000).

Las principales actividades beneficiosas atribuidas a los antocianos son las características antioxidantes de las dietas ricas en antocianos relacionadas con la salud cardiovascular (De Pascual-Teresa & Sánchez-Ballesta, 2008).

La actividad biológica de las antocianinas o los alimentos ricos en antocianinas se pueden manifestar en distintos niveles:

- Actividad anticancerígena, antitumoral y antimutagénica: los antocianos poseen capacidad antiinflamatoria con propiedades quimioprotectivas. Los alimentos ricos en antocianos inducen a la apoptosis en las células afectadas de leucemia de los humanos, y el mismo efecto se ha demostrado en las células hepáticas.
- Efectos beneficiosos en la diabetes: se pueden atribuir los efectos beneficiosos de los antocianos en dos niveles. Por un lado los antocianos intervienen en la absorción de la glucosa, y por el otro ejercen protección a las células pancreáticas.
- Estudios demuestran que los antocianos pueden estimular la secreción de insulina, siendo la pelargonidina el más potente estimulante (De Pascual-Teresa & Sánchez-Ballesta, 2008).
- Efectos oculares: el consumo de grosella tiene un positivo efecto sobre la visión nocturna como es la adaptación a la oscuridad, y en el caso de pacientes con miopía, los antocinanos disminuyen los síntomas (Lee, 2005).
- Actividad antimicrobiana y antiviral: diferentes frutas rojas tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias gram-negativas, aunque no sobre las bacterias gram-positivas.
- Efectos de procesos neurodegenerativos: frutas ricas en antocianos tienen un efecto beneficioso en el campo neuronal (De Pascual-Teresa & Sánchez-Ballesta, 2008).

### **- Beneficios de frutos de *Opuntia* con betalaínas**

Los pigmentos naturales procedentes de los frutos de *Opuntia*, las betalaínas, además de servir como ingredientes alimentarios con propiedades colorantes, juegan un papel importante como productos nutraceuticos disminuyendo así los riesgos para la salud que suponen los colorantes químicos y sintéticos (Sreekanth *et al.*, 2007).

Diversos estudios demuestran que el potencial antioxidante de los frutos del cactus está relacionado con los rasgos estructurales de las betalaínas que se caracterizan por mostrar efectos protectores de las células vasculares, directamente relacionados con la inflamación (Allegra *et al.*, 2005).

Tesoriere *et al.* (2005) investigaron que la incorporación de las betalaínas en la dieta protege a las células sanguíneas y evita procesos oxidativos y de hemólisis. A pesar de ser hidrofílicas, la indicaxantina y la betanina disminuyen el colesterol LDL tanto en estudios *in vitro* (Tesoriere *et al.*, 2003) como *in vivo* (Tesoriere *et al.*, 2004), aumentando su resistencia a la oxidación (Azeredo, 2008).

En la actualidad los frutos de *Opuntia* son considerados como una fuente importante de compuestos nutraceuticos y funcionales ya que contienen componentes saludables tales como las betalaínas, compuestos fenólicos, pectinas, vitamina C, calcio y magnesio, además de ser una fuente rica en aminoácidos como la prolina y la taurina que son ingredientes comunes en las bebidas energéticas (Díaz-García *et al.*, 2010).

Los frutos, palas y flores de *Opuntia* han sido usados tradicionalmente en la medicina para tratar la diabetes, hipertensión, asma, quemaduras, indigestión, reducir los niveles de colesterol, tratar úlceras, dolores reumáticos, inflamación, dolor y para combatir el veneno de serpiente. Los aztecas extraían el zumo lechoso de la planta y lo mezclaban con miel y yema de huevo para tratar las quemaduras. Los indios usaban los frutos como alimento y hacían sirope para tratar la tos provocada por el asma. En la medicina tradicional mexicana los frutos se usan en el tratamiento de la diabetes y el colesterol (Díaz-García *et al.*, 2010).

*Opuntia spp.* presenta actividades farmacológicas referenciadas como propiedades anti-inflamatorias y analgésicas (Loro *et al.*, 1999; Park & Kahng, 2001), anti-oxidantes (Gentile *et al.*, 2004; Tesoriere *et al.*, 2003, 2004), hipoglucemia (Galati *et al.*, 2002), anti-cancerígenas (Zou *et al.*, 2005), efectos neuroprotectivos frente a la actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2006) y anti-virales (Loro *et al.*, 1999). Además, los frutos del cactus pueden usarse para tratar la gastritis y arteriosclerosis (De Leo *et al.*, 2010; Ennouri *et al.*, 2006).

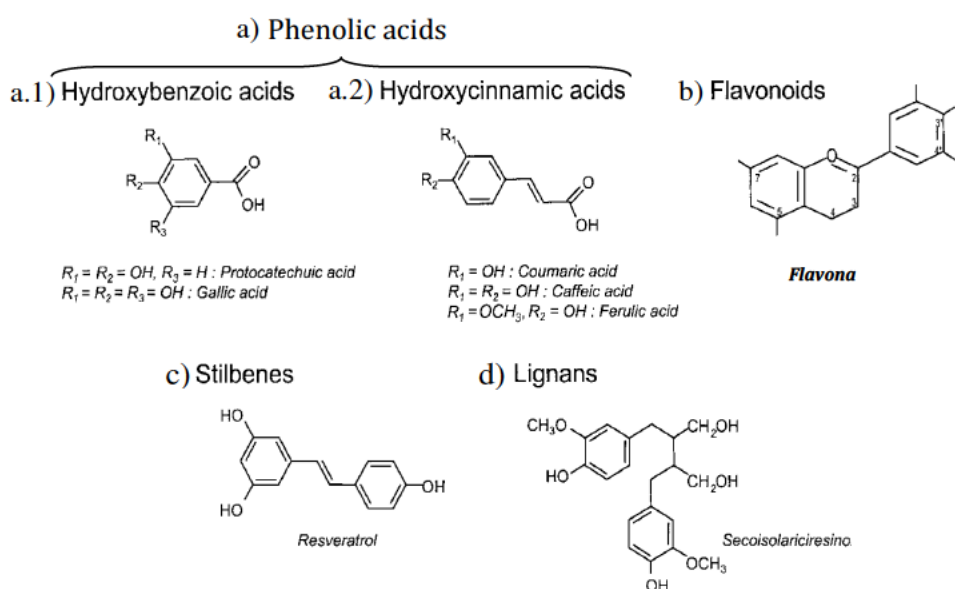
### 1.3.- LOS POLIFENOLES Y LAS BETALAÍNAS

#### 1.3.1.- Los polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que tienen más de un grupo fenol en sus moléculas, son producto del metabolismo secundario de los vegetales y se encuentran distribuidos en distintos tejidos de las plantas.

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos de estructura polifenólica. Se han identificado varios cientos de estas moléculas en plantas comestibles, algunas de las cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas, otras son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés hídrico, estrés luminoso (defensa contra la radiación ultravioleta) o frente a la agresión de patógenos (Manach *et al.*, 2004).

Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen unos anillos con otros (Manach *et al.*, 2004). Tal y como se muestra en la Figura 1.35 se puede distinguir entre: a) ácidos fenólicos, b) flavonoides, c) estilbenos y d) lignanos.



**Figura 1.35:** Estructura química básica de los polifenoles (Manach *et al.*, 2004)

Los ácidos fenólicos agrupan a los ácidos hidroxibenzoicos, derivados del ácido gálico, y a los ácidos hidroxicinámicos, derivados del ácido cinámico. En los flavonoides se incluye un amplio grupo de sustancias.

Los grupos alcohol de los polifenoles pueden estar glicosilados con distintos tipos de monosacáridos y oligosacáridos dando lugar a una amplia variedad de compuestos. Estas uniones se forman mediante enlaces glicosídicos por la pérdida de una molécula de agua entre el azúcar y el polifenol (aglicón o aglicona). Los glicósidos son solubles en agua, y un poco más solubles en etanol, metanol, o mezclas de ellos en agua, que las agliconas correspondientes. En las plantas, los glicósidos a menudo están acompañados de enzimas glicolíticas capaces de hidrolizarlos.

Los polifenoles, debido a su naturaleza aromática muestran intensa absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético, lo cual permite identificarlos y cuantificarlos.

A continuación se describen los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos vegetales.

#### **1.3.1.1.- Ácidos Fenólicos**

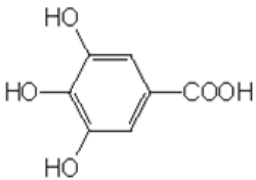
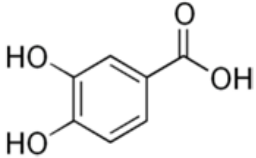
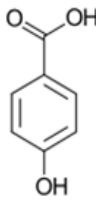
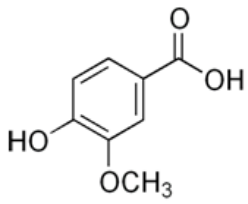
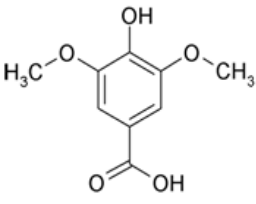
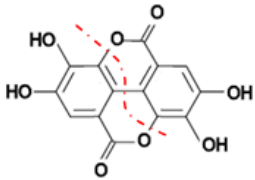
Los ácidos fenólicos son abundantes en los alimentos y se pueden distinguir dos grupos principales:

##### **a.1) Ácidos Hidroxibenzoicos**

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica  $C_6-C_1$  formada por un anillo aromático unido a un carbono a partir de fenilpropanoides a los que se les deleccionan dos carbonos de la cadena propánica.

Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden ser detectados en forma libre en algunas frutas. Los compuestos más representativos son ácido gálico, vanílico, 3,4 dihidroxibenzoico, 4 hidroxibenzoico y sirínico. La fórmula de alguno de éstos ácidos se representa en la Figura 1.36.

Su contenido en plantas comestibles es generalmente bajo, con la excepción de ciertas frutas rojas, las cebollas rojas o el rábano negro (Manach *et al.*, 2004). El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácido elágico), representado en la Figura 1.36, trímeros (ácido tergálico) o tetrámeros (ácido galágico) (García-Alonso, 2005).

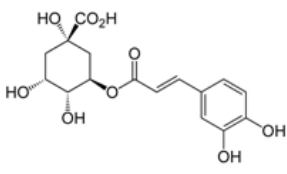
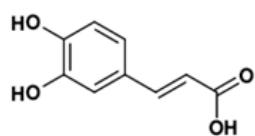
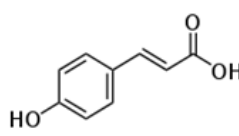
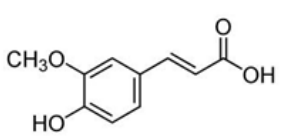
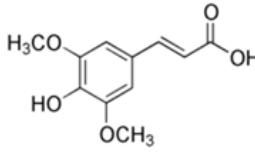
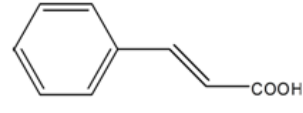
Ácido gálico	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	Ácido 4-hidroxibenzoico
$C_7H_6O_5$	$C_7H_6O_4$	$C_7H_6O_3$
		
Ácido vanílico	Ácido siringico	Ácido elágico
$C_8H_8O_4$	$C_9H_{10}O_5$	$C_{14}H_6O_8$
		

**Figura 1.36:** Estructura de algunos ácidos hidroxibenzoicos.

### a.2) Ácidos Hidroxicinámicos

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico son un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal y están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, entre ellas las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Tienen una estructura básica  $C_6-C_3$  compuesta por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo, son denominados hidroxicinámicos por la adición de uno o más grupos alcohol en el anillo aromático del ácido cinámico.

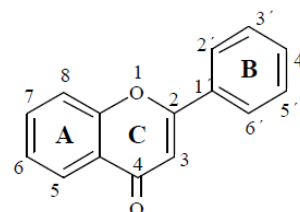
Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-Cumárico (Figura 1.37). Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico (Manach *et al.*, 2004).

Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -Cumárico
$C_{16}H_{18}O_9$	$C_9H_8O_4$	$C_9H_8O_3$
		
Ácido ferúlico	Ácido sinápico	Ácido cinámico
$C_{10}H_{10}O_4$	$C_{11}H_{12}O_5$	$C_9H_8O_2$
		

**Figura 1.37:** Estructura de algunos ácidos hidroxicinámicos.

### 1.3.1.2.- Flavonoides

Los flavonoides son un grupo numeroso de sustancias vegetales, y son los más abundantes dentro de los polifenoles, que fueron descubiertos por el Dr. Albert Szent-Györgi, Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1937 por sus descubrimientos en relación con los procesos de combustión biológica. El Dr. Szent-Györgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. En la Figura 1.38 se muestra su estructura química, poseen dos anillos aromáticos (bencénicos) (A y B) unidos entre sí por tres átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) que generalmente forman un heterociclo oxigenado (O).



**Figura 1.38:** Estructura básica de los flavonoides.

La mayoría de los tejidos de la planta pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glicósidos, solubles en agua, en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana. Los azúcares se unen al núcleo del flavonoide mediante enlace  $\beta$ -glicosídico, preferentemente en posición 3, aunque las uniones se pueden producir en otras posiciones. Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso tetrasacáridos (Hollman & Arts, 2000). Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico (Manach *et al.*, 2004).

Los flavonoides pueden dividirse en varias subclases en función de la sustitución en los anillos: chalconas, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas (El Gharas, 2009) tal y como se muestra en la Tabla 1.2 adaptada de Naczek & Shahidi, 2006.

Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides:

- Los flavonoides 3-hidroxiflavonoides (flavan-3-oles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas).
- Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas) (García-Alonso, 2005).

**Tabla 1.2:** Clasificación, nombres, sustituciones y presencia en la alimentación de flavonoides.

Clase	Nombre	Sustituyentes	Fuente en la dieta
Chalcona	Floridzina	5-O-glucosa, 7-OH; 4'-OH	Manzanas
	Floretina	5-OH, 7-OH; 4'-OH	
	Buteína	2,4,3',4'-OH	Varios
	Ocanina	2,3,4,3',4'-OH	
Flavona	Chrisina	5,7-OH	Apio, aceitunas, tomillo, orégano, romero, pimiento, alcachofa, perejil y el té.
	Apigenina	5,7,4'-OH	
	Luteolina	5,7,4'-OH	
	Triacetina	5,7,3',4',5'-OH	
Flavanona	Naringina	5,4'-OH; 7-rhamnoglucosa	Cítricos y menta
	Naringenina	5,7,4'-OH	
	Hesperetina	5,7,5',-OH; 4'-OCH <sub>3</sub>	
	Hesperidina	7,-O-rutinosido; 3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub>	
	Narirutina	5-OH, 7-O-rutinosido; 4'-OH	
Flavonol	Kaempferol	3,5,7,4'-OH	Cebolla, lechuga, brócoli, tomate, puerro, pomelo, té negro, bayas, manzanas, aceite de oliva y vino.
	Quercetina	3,5,7,3',4'-OH	
	Miricetina	3,5,7,3',4',5'-OH	
	Isorhamnetina	3,5,7,4'-OH; 3'-OCH <sub>3</sub>	
Isoflavona	Genisteína	5,7,4'-OH	Haba de soja
	Daidzin	4'-OH; 7-glucosa	
	Daidzeína	4',7-OH	
Flavan-3-ol	(+) Catequina	3,5,7,3',4'-OH	Uva, manzana, pera, albaricoque, melocotón, frambuesa, té y chocolate.
	(+) Galocatequina	3,5,7,3',4',5'-OH	
	(-) Epicatequina	3,5,7, 5',4'-OH	
Antocianidina	Cianidina	3,5,7,4',-OH; 3,5-OMe	Frutas rojas
	Delfinidina	3,5,7,3',4',5'-OH	
	Pelargonidina	3,5,7,4'-OH	
	Petunidina	3,5,7,3',4'-OH; 5'-OCH <sub>3</sub>	
	Peonidina	3,5,7,4'-OH; 5'-OCH <sub>3</sub>	
	Malvidina	3,5,7,4'-OH; 3',5'-OCH <sub>3</sub>	

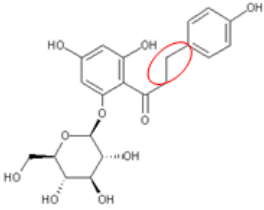
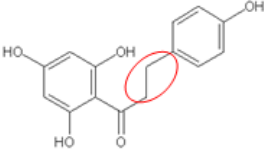
Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Los podemos encontrar en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, extractos de plantas como arándano y cardo (Martínez-Florez, 2002).

Veamos los distintos grupos de flavonoides uno a uno:

### b.1) Chalconas

Las chalconas, al contrario del resto de familias de flavonoides, se caracterizan por la unión de dos anillos aromáticos unidos con 3 carbonos sin que se forme heterociclo.

Las chalconas son abundantes en las frutas, verduras, especias, té y soja, y se caracteriza por poseer diversas actividades farmacológicas. Poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales y propiedades antiinflamatorias (Nowakowska, 2007). La Figura 1.39 muestra la estructura química de la floridzina y su aglicón floretina, que son dos de los principales tipos de chalconas que podemos encontrar en los alimentos. Estos compuestos son muy abundantes en la manzana.

Phloritzin	Phloretin
$C_{21}H_{24}O_{10}$	$C_{15}H_{14}O_5$
	

**Figura 1.39:** Estructuras de chalconas.



## b.2) Flavonas

Las flavonas son mucho menos comunes en frutas y verduras que el resto de los flavonoides pudiéndolas encontrar en el perejil, apio y trigo (El Gharas, 2009). Tienen coloración amarilla y pueden estar en algunas flores, como en la primula, coloreando sus pétalos y también en la piel de las uvas, siendo responsables del color amarillento de los vinos blancos. Se caracterizan por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas.

Se caracterizan por tener un doble enlace en el heterociclo en la posición 2-3, el carbono 4 es un grupo carbonilo.

Hay tres flavonas importantes que se muestran en la Figura 1.40: la apigenina, presente en muchas plantas como la camomila (*Matricaria recutita*) o el espio blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores; la luteolina, presente en las hojas y corteza del apio, tomillo, diente de león y flor de trébol, es de color amarillo y sirve para teñir lana y otros tejidos; y la triacetina está presente en el polen de algunas plantas.

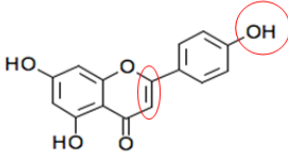
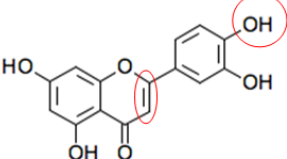
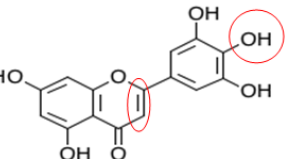
Apigenina	Luteolina	Triacetina
$C_{15}H_{10}O_5$	$C_{15}H_{10}O_6$	$C_{15}H_{10}O_7$
		

Figura 1.40: Estructuras de flavonas.

### b.3) Flavanonas

Las flavanonas se diferencian de las flavonas en que la insaturación del heterociclo no está presente.

Son beneficiosas para la salud por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y anti-inflamatorias (Benavente-García & Castillo, 2008).

Las flavanonas se encuentran en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta, pero sólo están presentes en altas concentraciones en los cítricos destacando la presencia de naringenina en el pomelo, hesperetina en las naranjas y eriodictyol en los limones (El Gharas, 2009), estos compuestos son responsables del sabor amargo de los cítricos.

Las flavanonas más abundantes en cítricos, representados en la Figura 1.41, son la hesperidina, naringina, narirutina, hesperitina, neohesperidina y naringenina (Benavente-García & Castillo, 2008).

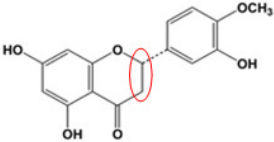
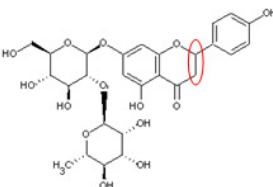
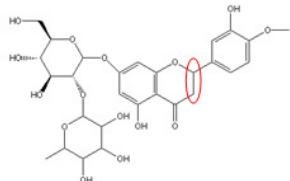
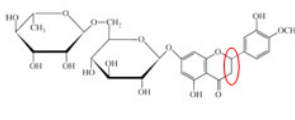
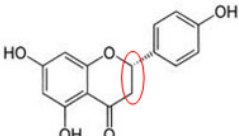
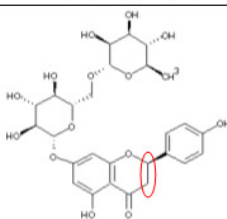
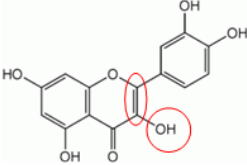
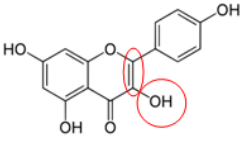
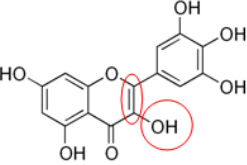
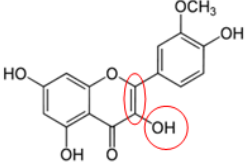
FLAVANONAS AGLICONAS		
Hesperitina	Naringina	Neohesperidina
$C_{16}H_{14}O_6$	$C_{27}H_{32}O_{14}$	$C_{28}H_{34}O_{15}$
		
FLAVANONAS GLICÓSIDOS		
Hesperidina	Naringenina	Narirutin
$C_{28}H_{34}O_{15}$	$C_{15}H_{12}O_5$	$C_{27}H_{32}O_{14}$
		

Figura 1.41: Estructura de flavanonas.

#### b.4) Flavonoles

Los flavonoles se encuentran ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal formando parte de nuestra dieta diaria. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Se conocen 450 tipos de agliconas y aproximadamente 900 tipos de glucósidos (Iwashina, 2000).

Los flavonoles generalmente están presentes en concentraciones relativamente bajas siendo las fuentes más ricas las cebollas, la col rizada, puerros, el brócoli, y los arándanos (Manach *et al.*, 2004). Por ejemplo, la miricetina se puede encontrar en la mayoría de las frutas y verduras; el kaempferol destaca en el té verde, uva, coles de bruselas, y la quercetina está presente en cebollas, manzanas, uvas, brócoli y té. En la Figura 1.42 se muestran algunos ejemplos.

Quercetina	Kaempferol	Miricetina	Isorhamnetina
$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{15}H_{10}O_6$	$C_{15}H_{10}O_8$	$C_{16}H_{12}O_7$
			

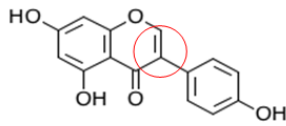
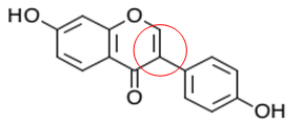
**Figura 1.42:** Estructuras de flavonoles.

### b.5) Isoflavonas

Junto con las flavonas representan el grupo polifenólico menos representativo de los alimentos. Se encuentran casi exclusivamente en las plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la fuente principal de aporte en nuestra dieta (El Gharras, 2009). Las más importantes son la genisteína y la daidzeína representadas en la Figura 1.43.

A diferencia de las flavonas que presentan un anillo fenólico en la posición 2, las isoflavonas lo tienen sustituido en la posición 3.

La doble actividad de las isoflavonas (actuando a la vez como estrogénicas y antiestrogénicas), le confiere una serie de cualidades que permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes que protegen frente al desarrollo de cáncer de mama y reducen los efectos de la menopausia. La mejor manera de consumir las isoflavonas es en forma de productos derivados de la soja ([www.isoflavones.info](http://www.isoflavones.info)). Estas propiedades de las isoflavonas han hecho que en los últimos años se comercialicen muchos productos elaborados a base de soja.

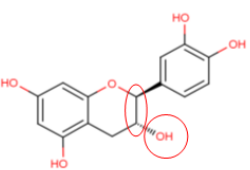
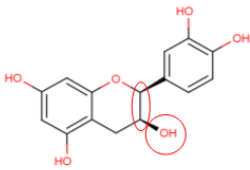
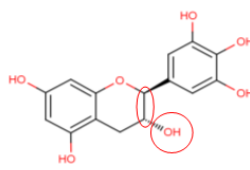
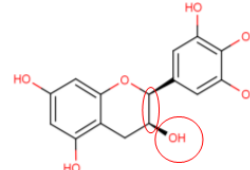
Genisteína	Daidzeína
$C_{15}H_{10}O_5$	$C_{15}H_{10}O_4$
	

**Figura 1.43:** Estructuras de isoflavonas.

### b.6) Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles constituyen una de las familias más comúnmente distribuidas en la naturaleza. Se pueden diferenciar unidades monoméricas como la (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, y estructuras poliméricas como las proantocianidinas. La catequina y epicatequina son los flavan-3-oles principales distribuidos en un amplio número de vegetales, mientras que la galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina-galato se encuentran en ciertas semillas de plantas leguminosas, en las uvas, el chocolate y en el té (El Gharras, 2009). Algunas de las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 1.44. Los flavan-3-oles glicosilados son poco frecuentes.

La molécula de los flavan-3-oles posee dos anillos bencénicos y un heterociclo dihidropirano con un grupo hidroxilo sobre el carbono 3. La galatocatequina y epigalatocatequina se caracterizan por tener un grupo OH en la posición 3 del heterociclo y un polifenol con 3 grupos alcohol en la posición 2.

(+)-Catequina	(-)-Epicatequina	(+)-Galocatequina	(-)-Epigalocatequina
$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{15}H_{14}O_7$	$C_{15}H_{14}O_7$
			

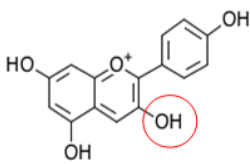
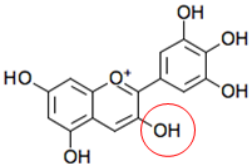
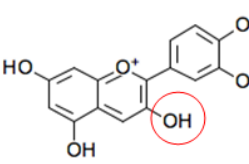
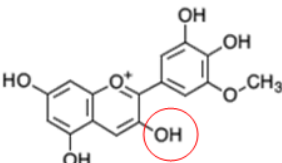
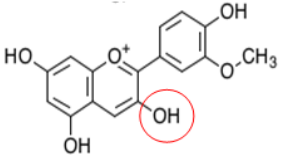
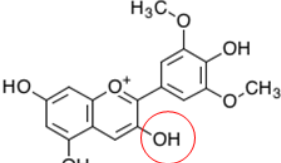
**Figura 1.44:** Estructuras de flavan-3-oles.

### b.7) Antocianos

Químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio (2-fenilbenzopirilio) que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico. Se caracterizan por la presencia de dos dobles enlaces, uno en la posición C1 y otro en el C3, y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo.

Están presentes en numerosos alimentos y verduras, frutos y flores. Generalmente se encuentran glicosilados dando lugar a los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas y grosellas (García-Alonso, 2005). Son moléculas relativamente inestables y sus colores dependen del pH, temperatura, luz y de la presencia de metales (Chen & Luo, 2010). Se utilizan como colorantes alimentarios de origen natural, y la acilación con ácidos cinámicos u otros ácidos similares les confiere una estabilidad adicional.

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son las seis que se muestran en la Figura 1.45. La combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas.

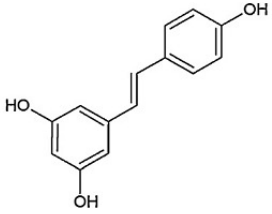
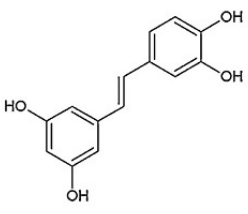
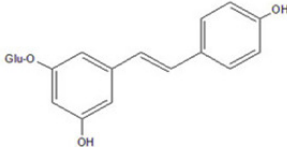
Pelargonidina	Delfinidina	Cianidina
Colorante anaranjado (E-163d)	Colorante azul-rojo (E-163b)	Colorante rojo (E-163a)
[C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup> ]	[C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup> ]	[C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup> ]
		
Petunidina	Peonidina	Malvidina
Colorante rojo oscuro (E-163f)	Colorante rojo-marrón (E-163e)	Colorante púrpura (E-163c)
[C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup> ]	[C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup> ]	[C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup> ]
		

**Figura 1.45:** Estructura de antocianidinas. Se muestra su nombre, coloración y calificación como colorantes alimentarios.

### 1.3.1.3- Estilbenos

Los estilbenos poseen una estructura básica formada por 14 carbonos ( $C_6-C_2-C_6$ ) y su distribución en los alimentos vegetales no es muy amplia (García-Alonso, 2005). Los estilbenos con mayor interés nutricional (Figura 1.43), presentes en uvas y vinos, son el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno), el piceatannol (3,3',4',5-trans-tetrahidroxiestilbeno) y el piceido (resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glucósido), sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1.46.

El resveratrol es el estilbeno más ampliamente distribuido en el Reino Vegetal, aunque sus fuentes en la dieta son escasas. Se encuentran en cacahuetes, algunas bayas y en la uva (piel y semillas), así como en sus derivados (zumo y vino) (Burns *et al.*, 2000). Sin embargo la concentración de estos compuestos se puede incrementar debido a que son fitoalexinas y, por tanto, inducibles por distintos tipos de estrés entre los que destaca el producido por la luz ultravioleta (Cantos *et al.*, 2001).

Resveratrol	Piceatannol	Piceido
$C_{14}H_{12}O_3$	$C_{14}H_{12}O_4$	$C_{20}H_{22}O_8$
		

**Figura 1.46:** Estructuras de estilbenos.

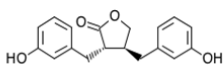
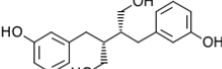
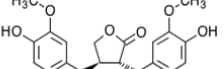
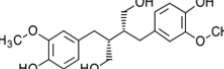
Este grupo de polifenoles ofrece una actividad antioxidante, anticancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora y antiinflamatoria. Estudios recientes en ratones han demostrado que ratones obesos cuya dieta estaba suplementada con resveratrol no solo son más longevos, sino además más activos, presentado en menor medida los efectos negativos de una dieta hipercalórica (Baur *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.4.- Lignanos

Los lignanos son metabolitos secundarios de las plantas presentes en semillas de lino, calabaza, plantas leguminosas como las lentejas, cereales como el trigo, zanahorias y frutas como peras, ciruelas y algunas bayas (El Gharras, 2009). Aunque están ampliamente distribuidos, sus cantidades son muy reducidas del orden de microgramos por cada gramo de producto seco, excepto en las semillas de lino, donde se encuentran a elevada concentración.

Su estructura básica consta de dos unidades C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, actúan en el organismo como fitoestrógenos al igual que las isoflavonas. Los lignanos son metabolizados hasta enterodiol y enterolactona por la microflora intestinal que tienen efectos parecidos a los estrógenos. La Figura 1.47 muestra algunos ejemplos.

Los lignanos están siendo estudiados para su posible uso en la prevención del cáncer, particularmente cáncer de mama además de tener efectos antioxidantes (Crosby, 2005).

Enterolactona	Enterodiol	7-hidroximatairesinol	Secoisolariciresinol
C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>
			

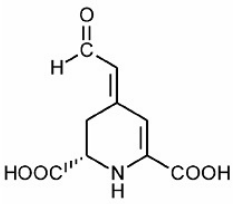
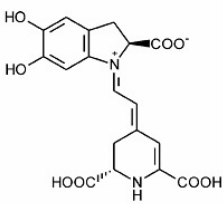
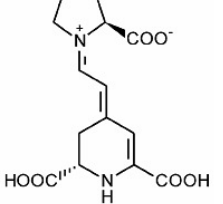
**Figura 1.47:** Estructuras de lignanos.



### 1.3.2.- Las betalainas

Las betalainas son un grupo de pigmentos presentes en algunas Familias del Orden *Caryophyllales*. Son metabolitos secundarios nitrogenados solubles en agua que se encuentran en disolución dentro de las vacuolas celulares. Aparecen en distintos tejidos dando coloración rojo-púrpura (betacianinas) y amarillo-naranja (betaxantinas). La mayoría de las plantas poseen como pigmentos rojos las antocianinas. En el Reino Vegetal las betalainas y antocianinas son excluyentes entre sí (Stintzing *et al.*, 2006).

En su estructura básica se encuentra el ácido betalámico que conjugado con ciclo-dopa origina las betacianinas y conjugado con aminoácidos o aminas, las betaxantinas. Estos compuestos también se encuentran glicosilados. La aglicona de las betacianinas es la betanidina, y una de las betaxantinas más abundantes, que contiene prolina, es la indicaxantina. La estructura química del ácido betalámico y de estas betalainas se muestra en la Figura 1.48.

Ácido betalámico	Betanidina (betacianina)	Indicaxantina (betaxantina)
$C_9H_9NO_5$	Coloración rojo-púrpura $C_{24}H_{27}N_2O_{13}$	Coloración amarillo-naranja $C_{14}H_{16}N_2O_6$
		

**Figura 1.48:** Estructura química del ácido betalámico, betanidina e indicaxantina, y su coloración.

Al contrario de lo que sucede en el caso de las antocianinas, el color de las betalainas no depende del pH y mantienen su color entre pH 4 y 7.

Las principales fuentes de betalainas existentes en la naturaleza son la remolacha, el amaranto y los frutos de algunos cactus como *Opuntia* (Franco-Zavaleta, 2004). El colorante natural E-162 betalaina o “rojo de remolacha” se obtiene de la remolacha. Los frutos de *Opuntia stricta* se han convertido en una fuente alternativa de betalainas para su uso como colorante alimentario natural (Stintzing & Carle, 2007), debido a la asociación de la remolacha con altos niveles de nitratos y contaminación microbiana por proceder de una raíz. El colorante obtenido de los frutos de *Opuntia stricta* no contiene nitratos y presenta mejores propiedades organolépticas que el de remolacha (Castellar *et al.*, 2003 y 2006).

#### 1.4.- ANÁLISIS DE POLIFENOLES Y BETALAÍNAS EN ZUMOS DE FRUTAS

El volumen de mercado de zumos, su valor comercial y el hecho de tratarse de productos destinados al consumo humano, hace imprescindible el control de calidad de los zumos y bebidas de frutas. Estos productos son susceptibles de sufrir distintos tipos de adulteraciones como la mezcla de zumos de mayor valor añadido con otros más económicos, la adición de azúcares y/o colorantes de modo fraudulento para abaratar costes, etc. Así, se ha creado la necesidad de disponer de métodos analíticos que permitan controlar la calidad y autenticidad de los zumos y bebidas de frutas.

El Código Alimentario de Zumos (CODEX STAN 247-2005), presenta las características esenciales de composición, calidad y autenticidad de los zumos y néctares de frutas, indicando los métodos de análisis que se deben utilizar como por ejemplo el método IFU nº 71 (1998) para la detección de las antocianinas, el método IFU nº 58 (1991) para la determinación de la hesperidina y naringina o el método IFU nº 65 (1995) para determinar el ácido tartárico en el zumo de uva.

El cumplimiento de estos parámetros mínimos, no implica que no tengan que ajustarse también a otros parámetros que afecten a su calidad y autenticidad. La Norma del *Codex Alimentarius* y el Código de Prácticas para la evaluación de zumos de frutas y vegetales propuesto por la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN) presenta una guía de referencia para cada tipo de fruta en la que se indican los parámetros de calidad requeridos como por ejemplo los grados Brix mínimos según la procedencia del zumo, requisitos como el contenido en metales, etc. ([www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org); [www.aijn.org](http://www.aijn.org))

Para el análisis de calidad y autenticidad es necesario disponer de métodos analíticos específicos. En el caso de compuestos funcionales como son los polifenoles que contienen un grupo amplio y diverso de especies químicas, se hace necesaria la separación y cuantificación de éstos mediante métodos que sean sensibles y selectivos (Ignat *et al.*, 2011; Valls *et al.*, 2009). A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, la separación y la cuantificación de los compuestos polifenólicos es difícil, sobre todo, la determinación simultánea de los diferentes grupos de polifenoles (Tsao & Yang, 2003).

Existen diversos métodos espectrofotométricos, algunos determinan los fenoles totales y otros cuantifican un grupo determinado de polifenoles. En general, estos métodos se basan en reacciones específicas de los grupos funcionales de compuestos fenólicos con determinados reactivos para formar compuestos coloreados. La cromatografía gaseosa (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizan para la separación y cuantificación de compuestos concretos; mientras que se recurre a la combinación de GC y HPLC con espectrometría de masas (MS) para la identificación y determinación de la estructura química (Tsao & Yang, 2003; Nacz & Shahidi, 2006; Ignat *et al.*, 2011).

#### 1.4.1.- Análisis espectrofotométricos

Los análisis espectroscópicos, en general, se basan en la forma de interactuar la radiación electromagnética con la materia. La energía depende de la longitud de onda y según la diferente respuesta de las moléculas a la radiación se da lugar a una gran diversidad de técnicas espectroscópicas. De entre ellas, el análisis espectrofotométrico trabaja en la región ultravioleta-visible del espectro, es decir, a longitudes de onda entre los 200 y los 900 nm.

En el análisis espectrofotométrico de polifenoles, debido a la diversidad molecular de este grupo de compuestos, se trabaja tanto en la región de ultravioleta como en el visible, ya que nos encontramos tanto con compuestos con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados capaces de absorber la radiación ultravioleta ( $\lambda$  180-350 nm), como con compuestos coloreados como las antocianinas, que son los pigmentos característicos de las frutas rojas, y que se detectan y cuantifican en el rango del visible ( $\lambda$  350-900 nm) (Giusti & Wrolstad, 2003).

Aunque muchos fenoles simples se pueden detectar en ultravioleta, su valor de absorbancia se ve influido por el disolvente y por el pH de la disolución. Además, la determinación en UV de compuestos fenólicos tiene el inconveniente de que interfieren con proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos, que también absorben en el rango del ultravioleta y que pueden estar presentes en los zumos dando un valor sobrestimado del contenido en polifenoles. De esta manera, el estudio espectroscópico en ultravioleta de polifenoles se reduce a la condición de disponer de compuestos puros.

Los estudios en estos casos se acompañan con la realización de espectros de absorbancia UV-Vis para facilitar el análisis y son solo un complemento a otras técnicas para establecer la naturaleza química del compuesto estudiado.

Para la cuantificación espectrofotométrica de los compuestos fenólicos se recurre a reactivos específicos que interactúan con todos los polifenoles, o con un grupo en concreto, para dar un producto coloreado que permite la cuantificación a una longitud de onda fija. En estos casos, normalmente el método se calibra con un estándar que es un polifenol de referencia perteneciente al grupo de polifenoles que se está analizando. Se han desarrollado así distintos métodos para la determinación de proantocianidinas, flavonoides, antocianos y polifenoles en su conjunto. Los valores cuantitativos se expresan con referencia al estándar utilizado en cada caso (Tsao & Yang, 2003).

Para cuantificar los flavan-3-oles, dihidrochalconas y proantocianidinas (taninos condensados) se dispone del método de la vainillina. Éste compuesto, que reacciona específicamente con aldehídos aromáticos para dar un compuesto coloreado, se utiliza junto a la catequina o a otro flavan-3-ol monomérico como estándar de calibración. Existen además de éste otros métodos similares para la determinación de taninos condensados (Hagerman, 2002; Naczki & Shahidi, 2006).

Respecto a los flavonoides, que son un importante grupo de polifenoles presentes en las frutas, se determinan con cloruro de aluminio (III) y utilizando el flavonoide quercetina como estándar para la calibración. Otros métodos también basados en la formación de complejos con Al (III) permiten determinar ácido cafeico o taninos totales (Pourmorad *et al.*, 2006; Naczki & Shahidi, 2006).

Las antocianinas son pigmentos que tienen un papel fundamental en la determinación de la calidad de un zumo y, también, en la aceptación por parte del consumidor ya que son los que confieren color a la mayoría de los zumos. Los métodos espectrofotométricos para su cuantificación se basan en la transformación reversible de grupos cromóforos de antocianinas en función del pH. Así se suele determinar la diferencia de absorbancia a dos valores de pH ácidos 4,5 y 1,0; tomando los valores de densidad óptica a 515 nm de una misma muestra preparada en sendos tampones al valor de pH correspondiente (Cheng & Breen, 1991; Naczki & Shahidi, 2006; Giusti *et al.*, 1998 y 1999).

Una medida muy habitual en zumos, sobre todo porque es requerida en el etiquetado según la legislación de muchos países, es el contenido total de polifenoles (TP). En este caso, el método de Folin-Ciocalteu es uno de los más utilizados para determinar los polifenoles totales en frutas y vegetales (Kanner *et al.*, 1994; Spanos & Wrolstad, 1990; González-SanJose & Diez, 1992). Este método se basa en la reducción de los reactivos fosfomolibdato y fosfotungstato, y utiliza ácido gálico como estándar, expresándose su cuantificación en equivalentes de ácido gálico. El reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico para polifenoles ya que también reacciona con otras sustancias reductoras como el ácido ascórbico y con proteínas solubles, por lo que es necesario hacer una corrección en la cuantificación final cuando se analizan zumos de frutas, sobre todo por la presencia de ácido ascórbico tan abundante en las frutas (Naczk & Shahidi, 2006; Skerget *et al.*, 2005).

En conjunto, aunque el espectrofotómetro sea la primera técnica empleada para la cuantificación de las diferentes clases de polifenoles por su simplicidad y bajo coste, los ensayos tradicionales llevan a una sobrestimación del contenido en polifenoles debido a que se solapan con las características espectrales de otros compuestos presentes en los zumos o que también reaccionan con los reactivos empleados (Liu *et al.*, 2008; Tsao & Yang, 2003; Naczk & Shahidi, 2006). Además no permiten establecer el tipo de fruta del que procede un zumo, con lo que no son apropiados para autenticar el origen de un zumo, ni para determinar posibles adulteraciones por mezclas de zumos o adición de endulzantes y/o colorantes. Se crea así la necesidad de disponer de otros métodos de análisis más específicos para la correcta identificación y cuantificación de polifenoles y también para la autenticación de los zumos de frutas.

#### **1.4.2. Análisis cromatográfico**

Mediante técnicas cromatográficas se pueden separar los distintos compuestos químicos presentes en una matriz, lo que facilita la identificación y cuantificación de cada uno de los componentes. La cromatografía abarca un amplio grupo de técnicas que tienen en común la separación de los distintos compuestos de una muestra en función de su distribución entre dos fases una móvil y otra estacionaria. La fase estacionaria puede ser sólida como en la cromatografía en papel (PC) o en la cromatografía en capa fina (TLC), o líquida como en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

y la cromatografía gaseosa (GC). Respecto a la fase móvil, suele ser líquida, excepto en la GC que, como su nombre indica, la fase móvil es un gas. También existe la cromatografía supercrítica, en la que la fase móvil es un fluido supercrítico (SF). Estas técnicas pueden tener distintas configuraciones: como cromatografía plana (PC y TLC), o en columna (HPLC, GC, SF). Además se pueden desarrollar a escala analítica, semipreparativa o preparativa, lo que permite el desarrollo de técnicas analíticas, y técnicas destinada a la purificación de cantidades significativas de un compuesto (Scott, 2002). Centrándonos en el análisis de polifenoles en frutas y otros vegetales se han empleado distintas técnicas cromatográficas, como la cromatografía en papel (PC), que es el origen de la cromatografía y se inició con el análisis de pigmentos vegetales. Esta técnica se ha utilizado con éxito en la separación de antocianos (Naczek & Shahidi, 2006).

También la cromatografía en capa fina (TLC) ha sido ampliamente utilizada para la purificación y aislamiento de antocianos, flavonoles, taninos condensados y ácidos fenólicos utilizando diferentes fases estacionarias y sistemas de elución (Ignat *et al.*, 2011; Cimpoiu, 2006; Rastija & Medic-Šaric, 2009).

Dentro de las cromatografías en columna, la cromatografía de gases es otra técnica que ha sido empleada para la separación e identificación de compuestos fenólicos. Sin embargo, aunque esta técnica tiene una gran capacidad de separación, y ofrece una alta sensibilidad y selectividad, la preparación de muestras es muy compleja, los polifenoles tienen una baja volatilidad, la presencia de glicósidos requiere de la hidrólisis previa de los polifenoles para liberar los aglicones y, en algunos casos, la derivatización para obtener los analitos volátiles (Drawert *et al.*, 1980). Cuando se combina con el espectrómetro de masas da mucha información sobre la estructura química, facilitando la identificación y caracterización de compuestos. (Robards & Antolovich, 1997; Zadernowski *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008).

Es sin duda la **cromatografía líquida** de alta eficacia (HPLC) la técnica más versátil y ampliamente utilizada en la caracterización de zumos y en la identificación y cuantificación de los polifenoles en general. El HPLC combina las ventajas de la separación y cuantificación simultáneas, sin la necesidad de una derivatización preliminar de la muestra, con la consiguiente reducción de costes y tiempo en el análisis (Markham, 1982).

En general, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se utiliza en el análisis de diversos compuestos, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y su aplicabilidad a sustancias como los polifenoles que son de primordial interés en la industria de zumos (Skoog *et al.*, 2003; Valls *et al.*, 2009).

En esta técnica cromatográfica la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija, también en estado líquido, unida covalentemente a un soporte inerte. Las columnas escogidas para la determinación de los compuestos fenólicos son mayoritariamente de fase reversa C18, de diámetro variable entre 2,1 y 5 mm, y de un tamaño de la partícula de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Sakakibara *et al.*, 2003).

La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas resultantes de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que cada compuesto se mueve por la columna y eluye en un tiempo de retención determinado. Los diferentes compuestos de una mezcla se separan mostrando tiempos de retención característicos. La fase móvil puede ser isocrática, de concentración fija, o un gradiente de concentración en el que se mezcla una fase acuosa (normalmente la fase móvil A) y una fase orgánica normalmente metanol o acetonitrilo (fase móvil B). El tiempo de retención de cada compuesto dentro de la columna es mayor para las moléculas de naturaleza más apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen con más rapidez. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos (Scott, 2002).

Las características del compuesto analizado tienen un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula, aunque las moléculas muy grandes pueden reducir la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros

lineales puesto que la superficie total se ve reducida. Una variable importante que puede variar la hidrofobicidad del compuesto es el pH, por lo que la mayoría de métodos utilizan un valor de pH definido. En el análisis de polifenoles la fase móvil se acidifica con diferentes ácidos entre ellos se emplea el ácido trifluoroacético, ácido acético y el ácido fórmico (Valls *et al.*, 2009; Ignat *et al.*, 2011; Scott, 2002).

A la salida de la columna los compuestos se detectan por diferentes sistemas de detección. Los polifenoles se detectan por UV-Vis a una longitud de onda fija (Fang *et al.*, 2007), o con un detector de fotodiodos (PDA) (Zuo *et al.*, 2002) que permite realizar espectros de los compuestos puros eluidos. Muchos polifenoles son fluorescentes, por lo que se pueden detectar por fluorescencia. El acoplamiento de un espectrómetro de masas a la salida de la columna, o en línea con otro detector, permite desarrollar técnicas analíticas selectivas para la identificación y cuantificación de compuestos desconocidos en muestras de frutas y zumos crudos o parcialmente purificados (Tian *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2006; Volpi *et al.*, 2006; Charrouf *et al.*, 2007). En los últimos años el desarrollo de este tipo de técnicas ha mejorado notablemente la identificación y caracterización estructural de compuestos fenólicos (Valls *et al.*, 2009; Caridi *et al.*, 2007). La aplicación de la espectrometría de masas de tandem (MS-MS) mejora aún más la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. Para el análisis cuantitativo, los espectrómetros de masas triple-cuadrupolo (QqQ) son los más usados. Sin embargo, los detectores MS-MS quedan limitados por las fragmentaciones y la baja e insuficiente resolución para inferir con un compuesto desconocido (Prasain *et al.*, 2004; McMaster, 2005; De Rijke *et al.*, 2006; Reemtsma, 2003).

La extracción de polifenoles es un paso importante en el aislamiento, la identificación y el análisis de compuestos fenólicos. Sin embargo, no hay un único método de extracción. La extracción con disolventes de diferente polaridad según los compuestos que se quieran extraer es una de las técnicas más usadas en el aislamiento de compuestos fenólicos, también ha sido utilizada la extracción con fluidos supercríticos (Baydar *et al.*, 2004; Bucic-Kojic *et al.*, 2007; Bleve *et al.*, 2008).



En muchos casos, debido a la compleja matriz que presentan los zumos de frutas y otros productos de origen vegetal, y a las limitaciones de algunos métodos de HPLC por su baja sensibilidad y límite de detección, se plantea la necesidad de realizar un tratamiento previo de la muestra para conseguir una mayor concentración de los compuestos que se quieren analizar. Así, existen diferentes procedimientos de pre-concentración inicial y purificación de los polifenoles antes de su análisis por HPLC. El objetivo es simplificar los cromatogramas para que se puedan identificar y cuantificar correctamente los compuestos.

La fase de la purificación puede ser una etapa crítica en el desarrollo de un método. Se trata de eliminar componentes que pueden interferir en el análisis de polifenoles. Los procedimientos incluyen la extracción líquido-líquido con un disolvente inmiscible, se pueden utilizar columnas de cromatografía líquida de baja presión con Sephadex LH-20, Polyamide o Amberlite como fase estacionaria para separar distintas fracciones. También se puede hacer una extracción sólido-líquido utilizando un cartucho comercial, donde los polifenoles se purifican por adsorción-desorción con adsorbentes eficientes como C18 o estireno-divinilbenzeno entrecruzado (Ignat *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005) También se han utilizado diferentes tipos de resinas macroporosas como adsorbentes (Silva *et al.*, 2007).

En algunos casos se hace un tratamiento previo de la muestra en la que se somete a hidrólisis química o enzimática, de manera que se analizan por HPLC las agliconas de los distintos polifenoles del zumo, con ello se reduce el número de compuestos pero no se identifican los polifenoles que realmente están presentes en la muestra.

El análisis directo de los zumos permite identificar su composición y autenticar la procedencia de las frutas que componen el zumo o bebidas de frutas. Una base de datos con la composición polifenólica de las frutas ayudaría a evitar posibles adulteraciones o fallos en el procesado de éstas que puedan causar fraude en el sector alimentario.

La separación y cuantificación de polifenoles continua siendo difícil, sobre todo cuando se quieren determinar simultáneamente polifenoles de diferentes grupos (Tsao & Yang, 2003). La Tabla 1.3 muestra distintas condiciones de análisis empleadas en la separación de diferentes grupos de compuestos fenólicos por HPLC. En todos los casos se emplea una fase estacionaria reversa y en la mayoría de los casos se trata

de una fase C18, aunque polifenoles de bajo peso molecular se pueden analizar con fases estacionarias directas, la fase reversa permite analizar un mayor número de compuestos. Respecto a las fases móviles, en general se emplean agua y acetonitrilo o metanol, acidificadas con distintos ácidos: trifluoroacético, acético o fórmico como ya se ha indicado anteriormente (Ignat *et al.*, 2011).

En general, en los análisis de HPLC el sistema de detección más extendido es el detector de fotodiodos (PDA) que permite coger la información en un rango de longitudes de onda y de ahí extraer cromatogramas a una longitud de onda determinada dependiendo de las características del compuesto que se esté analizando. Se pueden analizar así un número limitado de polifenoles en un mismo análisis.

Como podemos observar en la Tabla 1.3 los métodos descritos analizan uno o dos grupos de polifenoles, resultando difícil el análisis simultáneo de un mayor número de compuestos fenólicos. La detección es en todos los casos por espectrofotometría, en UV, en visible o con detector de fotodiodos (PDA). Para abarcar un mayor número de compuestos polifenólicos en un mismo análisis hay que recurrir a otros sistemas de detección. En este sentido, la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS) permite analizar moléculas de mayor peso molecular y es una forma muy efectiva para estudiar la estructura de compuestos fenólicos y determinar su naturaleza química (Bureau *et al.*, 2009). También se pueden acoplar otros detectores en línea con el PDA, como un detector de fluorescencia que detectaría los polifenoles fluorescentes. La Tabla 1.4 (Spácil *et al.*, 2008) muestra grupos de compuestos fenólicos analizados por HPLC con distintos sistemas de detección.

Existe la necesidad de disponer de métodos que permitan la detección simultánea de compuesto fenólicos en un solo análisis, para reducir el tiempo y los costes del análisis. Estos métodos tienen que ser capaces de caracterizar distintos polifenoles con selectividad y sensibilidad. En los últimos años se están desarrollando técnicas analíticas con equipos de cromatografía de alta presión (UHPLC o UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography), utilizando las mismas fases estacionarias que en HPLC, la alta presión permite trabajar con tamaños de partícula más pequeños, consiguiendo un tiempo de cromatograma más corto y una mejor resolución (Spácil *et al.*, 2008).

**Tabla 1.3:** Procedimientos de separación por HPLC de diferentes compuestos fenólicos (Ignat *et al.*, 2011).

Compounds	Stationary phase	Mobile phase		T (°C)	Flow rate (mL/min)	$\lambda$ (nm)	References
		A	B				
Catechines	C18 4.6 mm × 250 mm, 5 $\mu$ m	15% ACN	80% ACN	35	1	278	Chen <i>et al.</i> (2008)
Antocyanidines	C18 SS Wakosil	2% acetic acid 0.1% TFA in water	0.1% TFA in ACN	32	1	250–600 520	Bleve <i>et al.</i> (2008)
Antocyanins, flavone	C18 4.6 mm × 150 mm, 5 $\mu$ m	0.1% Formic acid in water	80% ACN in water	–	0.5–1	360	Fang <i>et al.</i> (2009)
Phenolic acids, flavonoids	Diamonsil™ C18 4.6 mm × 150 mm, 5 $\mu$ m	4% Acetic acid	Methanol	–	1	210–400	Fang <i>et al.</i> (2009); Wang <i>et al.</i> (2009)
Antocyanins (cyanidin-3-O-glucoside cyanidin-3-O-rutinoside)	C18 4.6 mm × 150 mm, 5 $\mu$ m	Water:formic acid 90:10	Water:ACN:formic acid 60:30:10	35	0.8	200–600	Bureau <i>et al.</i> (2009)
Polyphenols, flavonoids, phenolic acids	Lichrosorb C18 4.6 mm × 250 mm, 5 $\mu$ m	Methanol	Acetic acid:water (1:99)	–	1	327–370	Liu <i>et al.</i> (2008)
Phenolic acids	SunFire™ C18 4.6 mm × 150 mm, 5 $\mu$ m	0.1% Formic acid	100% methanol	25	0.7	270, 325	Ross <i>et al.</i> (2009)
Antocyanins	Phenomenex Gemini 4.6 mm × 150 mm, 5 $\mu$ m	Water:formic acid:ACN 87:10:3	Water:formic acid: ACN 40:10:50	20	1	520	Corrales <i>et al.</i> (2009)
Antocyanins, flavonols	Aqua, Phenomenex 4.6 mm × 250 mm, 5 $\mu$ m	5% Formic acid in water	Methanol	30	1	520, 360	Guerrero, Sineiro, and José Nunez (2008)
Antocyanins, Polyphenols	Mediterranean Sea 18 4.6 mm × 250 mm, 5 $\mu$ m	10% Formic acid in water	Methanol:water:formic acid (45:45:10, v/v/v)	30	0.8	530	Lapomik <i>et al.</i> (2005)
Flavonoids, phenolic acids	Superspher 100 RP, 250 × 4.6 mm 18.5 $\mu$ m (Merck) LiChroCart, 250–4, Hypersil ODS (5 $\mu$ m) Merck	2.5% acetic acid	Acetonitrile/2.5% acetic acid 80:20 v/v	–	1	280	Svedstrom <i>et al.</i> (2006)
Hydroxybenzoic acid derivatives, flavan-3-ols, dihydrochalcones, hydroxycinnamic acid derivatives, flavonols, anthocyanins	C18 Phenomenex Luna 250 mm × 4.6 mm 5 $\mu$ m	6% Acetic acid in 2 mM sodium acetate	Acetonitrile	–	1	280, 320, 360, 520	Tsao and Yang (2003)
Flavonols, quercetin 3,4'-diglucoside and quercetin 4'-monoglucoside	C18 Alltech Prevail 2.1 × 150 mm 3 $\mu$ m	0.1% Formic acid in water	0.1% formic acid in acetonitrile	30	0.2	280, 346, 364 and 370	Caridi <i>et al.</i> (2007)
Rosmarinic acid	C18 Hypersil 2.1 × 150 mm 3 $\mu$ m	0.1% Formic acid in water	0.1% formic acid in acetonitrile	30	0.2		
Quercetin, gallic acid, (+)-catechin and (–)-epicatechin; caffeic acid, p- coumaric acid, salicylic acid, and gentisic acid.	C8 Hypersil Gold column 250 × 4.6 mm 5 $\mu$ m	0.1% (v/v) TFA in water	0.1% (v/v) TFA in methanol	40		200–400 280, 360	Achamiale, Rezzonico, and Grignon-Dubois (2009)
Hydroxytyrosol, tyrosol, rutin, luteolin-7-glucoside, verbascoside, apigenin-7- glucoside, oleuropein, luteolin, caffeic acid, vanillic acid, catechin	C18 Waters Symmetry 150 × 4.6 mm 5 $\mu$ m	Acid methanol (1% acetic acid)	Acid water (1% acetic acid)	1		253 280 306 330	Alonso Garcia <i>et al.</i> (2004)
	C18 LiChrospher 250 × 4.6 mm 5 $\mu$ m	Acetic acid:water (2.5:97.5)	Acetonitrile	30	1		Altink <i>et al.</i> (in press)

**Tabla 1.4:** Detectores acoplados al HPLC para la detección de compuestos fenólicos (Spáčil *et al.*, 2008)

Method	Analytes	Run time (min)	Time per analyte (min)	Reference
HPLC–UV	Rutin; quercetrin; fisetin; myricetin; morin; luteolin; quercetin; apigenin; kaempferol; isorhamnetin; rhamnetin; galangin	60	5	Fang <i>et al.</i> , 2007
HPLC–DAD	Gallic acid; 3,5-dihydroxybenzoic acid; (–)-epigallocatechin; (–)-epigallocatechin gallate; (–)-epicatechin; (–)-epicatechin gallate; caffeine; (–)-catechin gallate; <i>p</i> -anisic acid; myricetin; 3,4,5-trimethoxycinnamic acid	25	2	Zuo <i>et al.</i> , 2002
HPLC–MS	6- <i>O</i> -Feruloylsucrose; 6- <i>O</i> -sinapoylsucrose; ferulic acid; sinapinic acid; <i>p</i> -coumaric acid; chlorogenic acid; caffeic acid; protocatechuic acid; hydroxybenzoic acid; vanillic acid; syringic acid	40	4	Tian <i>et al.</i> , 2005
HPLC–MS/MS	Naringenin; genistein; kaempferol; apigenin; pinocembrin; galangin; acacetin; chrysin	35	4	Volpi <i>et al.</i> , 2006
HPLC–MS/MS	Gallic acid; protocatechuic acid; catechin; isorhoifolin; epicatechin; procyanidin; rutin; hesperidin; hyperoside; isoquercitrin; quercetin- <i>O</i> -pentose; naringenin-7- <i>O</i> -glucoside; rhamnetin- <i>O</i> -rutinoside; quercetin; luteolin; naringenin	20	1	Charrouf <i>et al.</i> , 2007
HPLC–DAD–MS–FD–ED	Gallic acid; 5-HMF; protocatechuic acid; epigallocatechin; furfural; caftaric acid; <i>p</i> -hydroxybenzoic acid; <i>cis</i> -coumaric acid; catechin; caffeic acid; fertaric acid; epicatechin; vanillin; ferulic acid; <i>trans</i> -piceid; quercetin-3-glucuronide; quercetin-3-glucoside; <i>cis</i> -piceid; kaempferol-3-glucoside; quercetin-3-rutinoside; <i>trans</i> -resveratrol; <i>cis</i> -resveratrol; quercetin	80	3	Bravo <i>et al.</i> , 2006
HPLC–ECD	Gallic acid; protocatechuic acid; 4-hydroxybenzoic acid; 4-hydroxyphenylacetic acid; catechin; vanillic acid; chlorogenic acid; caffeic acid; syringic acid; <i>p</i> -coumaric acid; ferulic acid; sinapic acid; isoferulic acid; <i>o</i> -coumaric acid	50	4	Nardini & Ghiselli, 2004

### 1.4.3. Análisis de polifenoles en zumos

Entre los métodos de análisis de antocianinas para zumos de frutas rojas destaca el método IFU nº 71 (1998), que se considera como método de autenticación dentro de la Norma general para Zumos y Néctares de Frutas (*CODEX alimentarius*, CODEX STAND 247-2005). Es un método validado tipo I.

Las antocianinas son los principales componentes de los zumos de frutas rojas, se han desarrollado numerosos métodos para su caracterización si bien, el análisis por HPLC utilizando un detector de fotodiodos, es el método más extendido. Son muchos los laboratorios que utilizan los perfiles de antocianos de frutos rojos para verificar la autenticidad de productos alimentarios y controlar la calidad de esos productos. Así, hay un gran número de trabajos de investigación que caracterizan los perfiles de antocianos de muchos frutos, y prácticamente cada grupo investigador ha desarrollado un método analítico propio por HPLC para realizar estos análisis. Se suele utilizar acetonitrilo o metanol como fases móviles. El pH se suele mantener a un valor inferior a 2 por la adición de ácido fórmico ya que con un pH superior a 2 se obtienen picos más anchos debido a la interconversión entre especies. A pH inferior a 3,2 las antocianinas se encuentran en dos formas interconvertibles: el catión flavilio rojo y las especies quinoides azules. A pH 2,5 un 67 % están como catión flavilio, mientras que este porcentaje aumenta hasta el 96 % a pH 1,5. Después de incubar a temperatura ambiente

durante 24 horas a valores de pH menores de 3,3 más del 90 % de las antocianinas permanecen intactas. A pH 2 el valor aumenta al 100 %. No se detectan nuevos compuestos de degradación por HPLC.

El orden de elución de las antocianinas viene dado por la polaridad de las agliconas siendo éste el factor más importante que afecta a los tiempos de retención. Primero salen los derivados de la delfinidina, seguidos por los derivados de cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina.

El orden con respecto al azúcar es: sophorosa → galactosa → glucosa → sambubiosa → arabinosa → rutinosa. La presencia de azúcares disminuye la retención, eluyendo los diglicósidos antes que los monoglicósidos. La acilación aumenta el tiempo de retención. Amic (1993) asigna un orden de elución teórico que coincide con los datos experimentales. Se ha encontrado que aumentos en acetonitrilo del 6 % al 9 % (v/v) provocan inversiones de picos. Las antocianidinas y las antocianinas aciladas pueden quedar retenidas si la concentración de acetonitrilo es baja, por lo que se sugiere eluir estos compuestos con acetonitrilo puro.

Utilizando los picos característicos del espectro ( $\lambda_{vis}$ ,  $\lambda_{uv}$ , y  $\lambda_{acyl}$ ), y sus correspondientes absorptividades se permitirá identificar el tipo de antociano. La relación  $A_{440}/A_{vis-max}$  permite identificar las antocianinas como monósidos (la relación  $A_{440}/A_{vis}$  entre 26-32%) o diósidos (relación entre 15-24 %). Es posible determinar también el grado de acilación ácida aromática (la relación  $A_{acyl}/A_{vis}$  entre 53-69 % indica monoacilación y una relación de 98-128 % indica diacilación, Dyrby *et al.*, 2001). Además, en la región 290-340 nm la  $\lambda_{acyl}$  da información del anillo aromático acilante, si está en el rango entre 320-333 nm indica que es ácido sinápico o ferúlico, mientras que si se encuentra entre 310-315 nm indica que se trata de ácido *p*-Cumárico.

Para una mejor detección de los compuestos fenólicos, el empleo de UHPLC en vez de HPLC es recomendable. Con este cambio es necesario el empleo de columnas de análisis más pequeñas por lo que se logra disminuir el tiempo de análisis y el área de los picos porque éstos tienen una mejor resolución (Spácil *et al.*, 2008).

Además, desde las empresas también se fomenta el empleo de UHPLC e incluso existen programas de conversión de datos para adaptarse al empleo de UHPLC. El

empleo de este equipo supone una mejora en las condiciones de detección, ahorro de disolventes y disminución del tiempo de análisis entre otros, por ese motivo, nuestro trabajo se va a desarrollar con este equipo además del HPLC.

#### **1.4.4.- Bases de datos de la composición de alimentos**

El análisis de alimentos es fundamental para determinar la composición, y comprobar el estado de los alimentos, su autenticidad y origen. Los resultados científicos del análisis de diferentes alimentos se están recopilando en bases de datos que se pueden utilizar como un instrumento para conocer la composición o comprobar la autenticidad de un alimento.

La FAO está impulsando la elaboración de bases de datos de alimentos a nivel mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo. El objetivo desde esta organización es recopilar la información para diseñar dietas eco-sostenibles que sean nutritivas y permitan paliar el hambre y a la vez tratar de dinamizar las economías locales en los países en vías de desarrollo, ya que en muchos casos productos autóctonos tienden a ser sustituidos por otros importados sin considerar las propiedades nutricionales de los primeros y obviando las ventajas que para la economía local supone su consumo.

Así, para la FAO es necesario conocer la composición de los alimentos para fomentar el uso de las especies o variedades más nutritivas, ricas en micronutrientes, vitaminas, oligoelementos, etc. en lugar de otros alimentos menos saludables o de procedencias más lejanas que llevan implícito un transporte.

Además, para asegurar la alimentación de la población mundial hay que fomentar el estudio y uso de las especies autóctonas y estudiar las especies naturales antes de seguir desarrollando especies transgénicas. Se trata de diseñar dietas sostenibles que cubran las necesidades nutritivas del organismo pero que, a la vez, su cadena de producción sea más corta, menos costosa y reduzca las emisiones de CO<sub>2</sub>.

A partir de las Bases de Datos se podrán crear nuevos alimentos, planificar y crear dietas específicas, dar mayor información al consumidor en el etiquetado etc. Estas ideas han sido recogidas en la 9th International Food Data Conference, celebrada en Norwich, UK en septiembre de 2011 ([www.eurofir.net](http://www.eurofir.net)). La próxima conferencia

internacional sobre composición de alimentos auspiciada por la FAO se celebrará en Granada en 2013.

En España también se está trabajando en la elaboración de bases de datos de alimentos, en 2010 la Red BEDCA publicó la **Base de Datos Española de Composición de Alimentos** con el objetivo de unificar todas las publicaciones científicas que existen sobre la composición de los alimentos en un único sitio de manera que su consulta pueda ser mucho más rápida. De hecho componen la Red BEDCA diferentes organismos estatales y a su vez forma una red con el resto de los estados miembros de la Unión Europea para crear una Base de Datos de todos los alimentos de la Unión Europea ([www.bedca.net](http://www.bedca.net)).

Dentro de las bases de datos de alimentos, la composición en polifenoles de los alimentos está recogida principalmente en dos bases de datos: Phenol-Explorer 2.0 ([www.Phenol-Explorer.eu](http://www.Phenol-Explorer.eu)) y USDA database ([www.usda.gov](http://www.usda.gov)). Los datos recogidos proceden de trabajos científicos publicados en revistas especializadas de ámbito internacional.

El desarrollo del presente trabajo centrado en el análisis de compuestos funcionales que los zumos de frutas aportan es un complemento a las bases de datos existentes para la identificación y composición de las frutas estudiadas.

El desarrollo de métodos analíticos junto con las bases de datos proporciona herramientas útiles para el control de calidad de los alimentos, la autenticación de productos y la formulación de nuevos productos con unas características determinadas. En conjunto son instrumentos útiles para científicos, fabricantes, proveedores, consumidores y controles sanitarios.







---

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## **2.1.- JUSTIFICACIÓN**

El presente trabajo se ha desarrollado en el ámbito del análisis de polifenoles en los zumos de frutas, para determinar el perfil o la “huella dactilar” de éstos y así establecer unos criterios de calidad y autenticación del origen de un zumo. El estudio se ha hecho en relación con la industria productora de zumos y bebidas de frutas con la intención de diseñar un método de análisis útil no solo para los investigadores, sino también de aplicación práctica en la producción industrial de productos derivados de frutas. Así, se ha trabajado con concentrados de zumos y purés de fruta, que se utilizan habitualmente como materias primas en la elaboración de zumos y bebidas de frutas. También se han analizado zumos y smoothies comerciales destinados al consumo.

## **2.2.- OBJETIVOS**

El objetivo principal ha sido el desarrollo de un método de análisis que permita analizar simultáneamente en un mismo análisis, los distintos grupos de polifenoles presentes en los zumos de frutas. Se trata de tener un instrumento de análisis para determinar la composición y, a la vez, autenticar el origen de los zumos de fruta. El método será de gran utilidad para los fabricantes de bebidas y zumos de frutas, tanto para confirmar la composición y autenticar el origen de las materias primas de las que se proveen, como para el análisis de los productos que elaboran. Permitirá detectar además no solo adulteraciones, sino también errores no intencionados que hayan tenido lugar en el procesado como por ejemplo fallos en la clasificación, insuficiente lavado de los tanques de las líneas de procesado, etc.

Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos parciales:

### **Objetivo 1: Determinación del perfil de antocianos, betalaínas, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos en zumos de frutas rojas por HPLC-PDA-FLUORESCENCIA**

Partiendo del método de análisis por HPLC IFU nº 71 de determinación de antocianos, se va a mejorar para detectar simultáneamente otros polifenoles: ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos, también se va a utilizar para analizar otros pigmentos rojos no polifenólicos como son las betalaínas y colorantes rojos

alimentarios que se pueden añadir fraudulentamente a los zumos. Se va a trabajar con frutas rojas (fresa, frambuesa, mirtilo, arándano americano y europeo, grosella negra, cereza, mora, uva tinta, zanahoria morada e higo chumbo). Aprovechando el carácter fluorescente de muchos de los compuestos que se van a estudiar, se va a modificar el método IFU nº 71, añadiendo un detector de fluorescencia en línea con el de PDA.

### *1.1.- Optimización de las condiciones de detección y análisis:*

En primer lugar se van a optimizar las condiciones de detección. Para ello se van a seleccionar patrones comerciales de los distintos grupos de polifenoles a estudiar: antocianos, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos. Se van a obtener los espectros de absorbancia y fluorescencia de los patrones seleccionados para establecer las condiciones óptimas de detección por PDA-FLUO.

### *1.2.- Obtención del perfil de antocianos, betalainas, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos en zumos de frutas rojas por HPLC-PDA-FLUO:*

Con las condiciones de detección optimizadas se van a analizar once frutas rojas para determinar su perfil de antocianos o betalainas, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos y estilbenos. Este perfil será característico de cada fruta y servirá para autenticar la naturaleza de un zumo. La identificación de los compuestos se realizará fundamentalmente atendiendo a los tiempos de retención de los patrones, a los espectros de UV/Vis-Fluorescencia de los picos de cada compuesto y a la composición de las frutas descritas en trabajos previos por diferentes autores y publicados en revistas científicas. Además, en aquellos casos en que sea necesario, se utilizará un detector de masas (HPLC/MS) para los compuestos cuya identificación sea dudosa.

### *1.3.- Análisis de colorantes rojos alimentarios por HPLC-PDA-FLUO:*

Los zumos de frutas rojas comerciales son susceptibles de sufrir adulteraciones con colorantes artificiales, por lo que también se analizarán algunos colorantes alimentarios rojos (carmoisina, amaranto, ponceau 4R, eritrosina, rojo 2G, rojo allura y carmín cochinilla), de manera que se puedan detectar en el mismo análisis que los polifenoles, poniendo de manifiesto posibles fraudes.

*1.4.- Elaboración de una Tabla de la composición de antocianos, betalainas, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos, estilbenos y colorantes alimentarios rojos:*

Se van a recopilar en una Tabla todos los datos obtenidos de los análisis, indicando los distintos compuestos detectados en cada fruta, su concentración relativa y su tiempo de retención en el cromatograma. Esta Tabla será una herramienta útil para los investigadores pero, sobre todo, para los fabricantes de zumos y de bebidas elaboradas con frutas.

**Objetivo 2: Optimización de un método de análisis rápido por UHPLC para polifenoles en zumos y bebidas de frutas**

Una vez optimizada la detección por HPLC y obtenidos los datos de las frutas y colorantes estudiados, se plantea mejorar el método de análisis utilizando un equipo de UHPLC que permite trabajar a mayor presión, obteniendo una mejor resolución en un tiempo más corto. La finalidad es obtener con un único análisis la mayor cantidad de información posible al poder detectar simultáneamente otros grupos de polifenoles distintos a los ya estudiados, y poder incrementar así el contenido de la tabla de datos de las frutas analizadas. Así, manteniendo la detección en línea PDA-FLUO se van a optimizar distintas condiciones de análisis:

- Acidificación de la fase móvil.
- Tamaño de partícula y dimensiones de la columna de análisis.
- Temperatura y flujo de análisis.
- Gradiente de elución.

**Objetivo 3: Determinación del perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de frutas por UHPLC-PDA-Fluorescencia**

Disponiendo ya de un nuevo método de análisis para la detección simultánea de distintos grupos de polifenoles se va a completar el perfil polifenoles en las frutas rojas anteriormente estudiadas, analizando otros grupos de polifenoles: flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas. Además, el método se va a hacer extensivo al análisis de otros zumos que no son de frutas rojas pero cuyo elevado consumo justifica el estudio, en estos zumos se van a analizar conjuntamente todos los grupos de polifenoles estudiados.

### *3.1.- Optimización de las condiciones de detección de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas:*

Para la consecución de este objetivo se va a comenzar optimizando las condiciones de detección de los nuevos polifenoles en estudio. Para ello se van a seleccionar patrones comerciales de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas; de los que se obtendrán sus espectros de absorbancia y fluorescencia para establecer las condiciones óptimas de detección por PDA-FLUO.

### *3.2.- Determinación del perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de frutas rojas por HPLC-PDA-FLUO:*

Con las condiciones de detección optimizadas se van a analizar las siguientes frutas rojas: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano Europeo y Americano, grosella negra, cereza, uva tinta y mora; para determinar su perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas. Estos estudios, que volverán a dar un perfil característico de cada fruta, complementarán la información que se obtenga de cada fruta en el Objetivo 1, y contribuirán a una mejor autenticación de los zumos en estudio.

### *3.3.- Obtención de perfil de polifenoles en naranja, manzana y plátano por HPLC-PDA-FLUO:*

Estas tres frutas se van a analizar para obtener en un único análisis el perfil de todos los polifenoles estudiados teniendo en cuenta los grupos de polifenoles presentes en cada una de ellas. La naranja y la manzana se estudian por ser los zumos mayoritariamente consumidos. El plátano se estudia por la importancia que está adquiriendo como componente en muchos zumos de mezclas de frutas y por estar siempre presente en los smoothies.

### *3.4.- Elaboración de una Tabla de la composición de flavonoles, flavonas y dihidrochalconas identificados en las frutas estudiadas:*

Se va a construir una Tabla recopilatoria con los componentes identificados en cada uno de los zumos analizados, indicando la concentración relativa y el tiempo de retención de cada compuesto. Esta Tabla complementará a la obtenida en el Objetivo 1 y será de utilidad tanto para fabricantes de zumos y de bebidas elaboradas con frutas, como para investigadores.

Todos los resultados obtenidos y recopilados en ambas Tablas complementarán la información que ya hay recogida en las bases de datos de compuestos fenólicos.

#### **Objetivo 4: Cuantificación de los polifenoles**

Para seguir mejorando el método y su utilidad es necesario que sea no solo cualitativo, sino también cuantitativo. Debido al elevado número de compuestos químicos presentes en las frutas, la cuantificación con estándar externo disponiendo de patrones puros de cada analito no es posible. En consecuencia se plantea la cuantificación fijando un patrón o estándar para cada grupo de polifenoles analizado (antocianos, ácidos fenólicos, flavanoles monoméricos, estilbenos, flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas). Se expresará la concentración de cada compuesto en función de la relación de su área correspondiente con respecto a la del estándar del que se conocerá su concentración real.

De la suma de todos los polifenoles analizados en cada muestra se determinará el valor de Polifenoles Totales Individuales (TIP, Total Individual Polyphenols), que es importante conocer para etiquetar los productos e informar al consumidor.

También se determinará el valor de Polifenoles Totales (TP, Total Polyphenols), por métodos colorimétricos, debido a que es esta la forma habitual de determinar polifenoles para cubrir los requerimientos de etiquetado de los zumos.

Se establecerá una comparación entre la determinación de TIP y TP en las frutas estudiadas.

##### *4.1.- Cuantificación por UHPLC de los polifenoles individuales (TIP):*

Se va a analizar y cuantificar la composición polifenólica de doce zumos: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo y americano, cereza, grosella negra, uva tinta, mora, naranja, manzana y plátano. La cuantificación de los polifenoles individuales presentes en cada uno de ellos será necesaria para obtener el respectivo valor de TIP.

##### *4.2.- Determinación de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu:*

Como método colorimétrico de determinación de polifenoles totales se va a utilizar el de Folin-Ciocalteu por ser el habitualmente utilizado.

Se establecerá una correlación entre los valores de TIP obtenidos por UHPLC y los valores de TP obtenidos por colorimetría.

**Objetivo 5: Análisis y cuantificación de los compuestos fenólicos en bebidas de frutas comerciales**

El trabajo realizado se completará con el análisis cualitativo y cuantitativo de los polifenoles presentes en diversos productos comerciales: zumos elaborados a base de frutos rojos y smoothies elaborados a base de diferentes frutas. Se determinará la composición de polifenoles, comprobando que sea concordante con la de los zumos indicados en el etiquetado. También se hará la determinación cuantitativa de TIP y TP comparando ambos valores. Estos análisis mostrarán la utilidad práctica de este trabajo.







---

### CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1- MATERIALES

#### 3.1.1.- Patrones de polifenoles

Los patrones de polifenoles recogidos en las Tablas 3.1 y 3.2 han sido adquiridos a diversas casas comerciales y pertenecen a diversos grupos: antocianos, flavonoles, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavanonas, dihidrochalconas, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. Además se estudió la vitamina C (ácido ascórbico) por su presencia en las frutas, y betalaínas presentes en *Opuntia stricta* aunque de éstas no se dispone de patrones comerciales.

**Tabla 3.1:** Denominación, fórmula química condensada y casa comercial suministradora de los distintos patrones de polifenoles analizados.

Nombre según la IUPAC	Sinónimo	Fórmula química condensada	Casa comercial
<b>ANTOCIANOS</b>			
Pelargonidin 3-glucosido	Callistephin chloride	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	Extrasynthèse
<b>FLAVONOLES – Agliconas</b>			
Kaempferol	Robigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	Fluka Chemie
3,3',4',5,6-Pentahidroxiflavona	Quercetin dihydrate	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Fluka Analytical
Rhamnetina	---	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Fluka Analytical
Isorhamnetina	---	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Fluka Chemie
Miricetina	Cannabiscetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	Sigma
Dihydroquercetina	Taxifolin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Fluka Analytical
3,5,7-Trihidroxiflavona	Galangin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Extrasynthèse
<b>FLAVONOLES – Glicósidos</b>			
Quercetin-3-O-rhamnosido	Quercitrin hydrate	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> · H <sub>2</sub> O	Sigma
Kaempferol-3-O-glucosido	Astragalin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Extrasynthèse
Kaempferol-3-Orutinosido	Nicotiflorin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	Extrasynthèse
Quercetin-3-O-glucosido	Isoquercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Fluka Analytical
Quercetin-3-O-galactosido	Hyperoside, hyperin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Fluka Analytical
Quercetin-3-rutinosido trihidratado	Rutin trihydrate	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> · 3H <sub>2</sub> O	Fluka Analytical
Kaempferol-7-O-glucosido	---	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Extrasynthèse
Isorhamnetin-3-O-glucosido	---	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	Extrasynthèse
Isorhamnetin-3-O-rutinosido	Narcissin	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	Extrasynthèse

**Tabla 3.2:** Denominación, fórmula química condensada y casa comercial suministradora de los distintos patrones de polifenoles analizados.

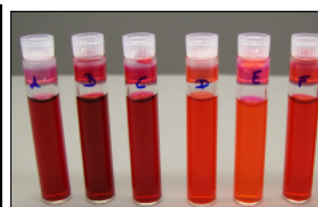
Nombre según la IUPAC	Sinónimo	Fórmula química condensada	Casa comercial
<b>ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS</b>			
Ácido 3,4,5-Trihidroxibenzoico	Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Fluka Analytical
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	Ácido gentísico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	Ácido protocatecúlico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 3-Hidroxibenzoico	Ácido 3-Hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 4-Hidroxibenzoico	Ácido 4-Hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxibenzoico	Ácido vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Fluka Analytical
Ácido 3-Hidroxi-4-metoxibenzoico	Ácido isovanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico	Ácido sirínico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Sigma
Ácido elágico	---	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Fluka Analytical
<b>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS</b>			
Ácido 3-cafeoilquínico	Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Sigma
Ácido (trans) 2-Hidroxicinámico	Ácido o-Cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido (trans) 3-Hidroicinámico	Ácido m-Cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Fluka Analytical
Ácido 3-(4-Hidroxifenil) acrílico	Ácido p-Cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma
Ácido 3-(4-Hidroxifenil) propiónico	Ácido florético	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido dihidrocafeico	---	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Extrasynthèse
Ácido 1,3-Dicafeoilquínico	Cynarin	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	Extrasynthèse
Ácido 3-(3,4-Dihidroxifenil) acrílico	Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Sigma
Ácido (trans) 3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) acrílico	Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido (trans) 3-Hidroxi-4-metoxi-cinámico	Ácido isoferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 3-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil) acrílico	Ácido sinápico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Fluka Analytical
Ácido (trans) 4-metoxi-cinámico	Ácido p-Cumárico metil eter	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido (trans) 3,4-dimetoxi-cinámico	Ácido cafeico dimetil ether	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Aldrich Chemistry
Ácido 3-cafeoiltartárico	Ácido caftarico	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Sigma
Ácido (trans) cinámico	---	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Aldrich Chemistry
<b>FLAVANONAS</b>			
Didimin	---	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	Extrasynthèse
Hesperidina 7-O-rutinosido	---	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	Extrasynthèse
Narirutina	---	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	Extrasynthèse
Naringina	---	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	Extrasynthèse
<b>DIHIDROCHALCONAS</b>			
Floridzina	---	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Extrasynthèse
<b>FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS</b>			
(+)-Catequina hidrato	---	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> .aq	Aldrich Chemistry
(+)-Catequina	---	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> .aq	Sigma
(-)-Epicatequina	---	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Fluka Analytical
(-)-Epigallocatequina galato	---	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Sigma
(-)-Epigallocatequina	---	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Sigma
<b>ESTILBENOS</b>			
Resveratrol	---	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	Sigma

### 3.1.2.- Colorantes rojos alimentarios

Los colorantes de color rojo utilizados habitualmente en la industria alimentaria que han sido analizados en este estudio se muestran en la Tabla 3.3 donde también se ha incluido el código de identificación por letras asignado a cada compuesto, y su designación como colorante alimentario. Todos proceden de la misma casa comercial y fueron suministrados en forma de polvo. Cabe destacar que el E-120 es un colorante natural y que el uso alimentario del colorante artificial E-128 (Rojo 2G) está prohibido desde 2007 ([www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).

**Tabla 3.3:** Listado de colorantes rojos de uso alimentario analizados.

Iden.	Tipo	Colorante	Nombre	Casa comercial
A	Artificial	E-122	Carmoisina	Roha Epsa S.L. (Valencia)
B		E-123	Amaranto	
C		E-124	Ponceau 4R	
D		E-127	Eritrosina	
E		E-128	Rojo 2G	
F		E-129	Rojo Allura	
G	Natural	E-120	Rojo Cochinilla	



**Fig 3.1:** Disoluciones a 1 mg/mL de colorantes rojos artificiales.

En la Figura 3.1 se muestra el color de la disolución final de los colorantes artificiales disueltos en agua a una concentración de 1 mg/mL y en la Figura 3.2 se muestra la estructura química de la mayoría.

E-122. Carmoisina	E-123. Amaranto	E-124. Rojo Ponceau 4R
E-127 Eritrosina	E-128 Rojo 2G	E-129. Rojo Allura AC

**Figura 3.2:** Estructura química de algunos colorantes artificiales estudiados.

### 3.1.3.- Zumos y smoothies de frutas

Se estudiaron varios zumos de frutas rojas en sus diferentes formas: purés, zumos y zumos concentrados, y los zumos mayoritariamente consumidos a nivel mundial como son la naranja y la manzana. También se estudió el plátano debido a su presencia en los smoothies.

Los proveedores fueron distintas casas comerciales y empresas dedicadas a la producción y comercialización de zumos y bebidas de fruta. Además se estudiaron zumos comerciales de mezclas de frutas y smoothies obtenidos en comercios locales. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C en el laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

#### - Zumos comerciales AntiOx

En la Figura 3.3 y la Tabla 3.4 se muestra el listado de los zumos comerciales AntiOx seleccionados para el estudio y se indican sus características más significativas en cuanto a la composición.

**Tabla 3.4:** Listado de zumos comerciales AntiOx estudiados, características y proveedores.

Zumos AntiOx	Especificaciones	° Brix	pH	Marca
<b>Antioxidante exprimido Eroski</b>	Zumo de uva roja (73%), puré de frambuesa (20%), puré de cereza (7%).	12,4	3,5	Eroski
<b>Antiox Sumo de Frutos Vermelhos Pingo doce</b>	Zumo de frutos a base de concentrado (80%) (manzana, uva, fresa, frambuesa, arándano y grosella), agua, antioxidante (ácido ascórbico) y aromas.	12,6	4,1	Don Simón
<b>Compal Vital AntiOx Frutos Rojos</b>	Agua, zumo de uva tinta, manzana, grosella, fresa, frambuesa y arándano a base de concentrados, antioxidante: ácido ascórbico, edulcorantes: aspartato y acesulfame k.	4,1	3,5	Compal
<b>Compal Vital AntiOx Frambuesa</b>	Agua, zumo y pulpa de frambuesa (28%) y manzana (22%) a base de concentrados, antioxidante: ácido ascórbico, edulcorantes: aspartato y acesulfame k.	4,9	3,8	Compal



**Figura 3.3:** Zumos antiOx comerciales analizados.

### - Smoothies

El smoothie seleccionado para el estudio y sus características se muestran en la Figura 3.4 y la Tabla 3.5. La selección se basó principalmente en su composición con los frutos rojos que estudiamos también de forma individual.



**Tabla 3.5:** Smoothie estudiado, características y proveedor.

Smoothies	Especificaciones	° Brix	pH	Marca
Smoothie Eroski	Zumo manzana, puré frambuesa (18%), puré fresa (15%), puré plátano (14%), puré arándano, zumo naranja.	12,1	3,86	Eroski

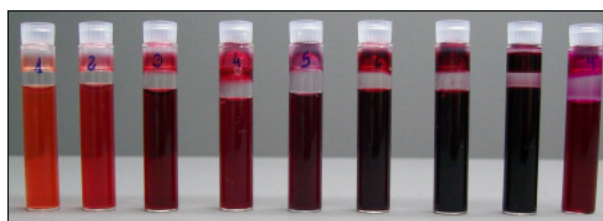
**Fig. 3.4:** Smoothie de estudio.

### - Zumos rojos

La Tabla 3.6 muestra los zumos y purés de frutas rojas estudiados, el número asignado para su estudio e identificación en la Figura 3.5, los grados brix y la casa comercial que lo ha suministrado. El color de estos zumos y purés ya preparados para su análisis se muestra en la Figura 3.5.

**Tabla 3.6:** Frutas rojas estudiadas, características y proveedores.

Nº	Frutas Rojas	Especificaciones	° Brix	pH	Casa comercial
1	Fresa (Strawberry)	Puré	6,8	3,32	J. García Carrión S.A.
	<i>Fragaria x Ananasa D.</i>				
2	Frambuesa (Raspberry)	Puré	7,2	2,92	J. García Carrión S.A.
	<i>Rubus idaeus L.</i>				
3	Mirtilo (Blueberry)	Zumo concentrado	64,5	3,11	Grünewald (Austria)
	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>				
4	Arándano Europeo (European cranberry)	Zumo concentrado	62,2	2,3	Grünewald (Austria)
	<i>Vaccinium oxycoccus L.</i>				
5	Grosella negra (Blackcurrant)	Zumo concentrado	64,4	2,29	J. García Carrión S.A.
	<i>Ribes nigrum L.</i>				
6	Cereza agria (Sour cherry)	Zumo concentrado	60,2	3,13	Mondifood (Bélgica)
	<i>Prunus cerasus L.</i>				
7	Uva tinta (Red grape)	Zumo concentrado	65,6	3,86	J. García Carrión S.A.
	<i>Vitis vinifera L.</i>				
8	Zanahoria morada (Purple carrot)	Zumo concentrado	70,7	3,54	Exberry GNT
	<i>Daucus carota</i>				
9	Higo chumbo (Prickly pear)	Zumo	7,5	3,8	Laboratorio UPCT
	<i>Opuntia stricta</i>				
10	Arándano Americano	Zumo concentrado	63,1	2,5	Oceans Sprays (USA)
	<i>Vaccinium macrocarpon Ait.</i>				
11	Mora	Puré	11,1	3,08	J. García Carrión S.A.
	<i>Rubus fruticosus L.</i>				



**Figura 3.5:** Disoluciones de los zumos y purés de frutas rojas estudiados.

### - Zumos más comercializados

En la Figura 3.6 y en la Tabla 3.7 se muestra el listado de los zumos mayoritariamente consumidos a nivel mundial como son la naranja y manzana. Además, se estudió el plátano por su presencia en los smoothies.



**Fig. 3.6:** Zumos más consumidos.

**Tabla 3.7:** Zumos de sabores más consumidos, características y proveedores.

Zumos	Especificaciones	° Brix	pH	Casa comercial
<b>Naranja (Orange)</b>	Zumo	10,8	3,5	J. García Carrión S.A.
<i>Citrus sinensis L. Osbeck.</i>				
<b>Manzana (Apple)</b>	Zumo	11,1	3,38	Carrefour
<i>Malus pumila P. Mill.</i>				
<b>Plátano (Banana)</b>	Néctar	12,8	3,48	J. García Carrión S.A.
<i>Musa L.</i>				

#### 3.1.4.- Reactivos químicos

- **Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )** (Acetonitril for HPLC-Super Gradient) procedente de los laboratorios Panreac-Química (Barcelona, España).
- **Ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ )** (Formic acid 98-100 %) procedente de los laboratorios Sigma-Aldrich (Alemania).
- **Ácido trifluoroacético ( $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ )** (Trifluoroacetic acid for synthesis) procedente de los laboratorios Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Alemania)
- **Agua purificada** en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).
- **Reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu** procedente de la casa comercial Merck (Alemania).
- **Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )** procedente de los laboratorios Panreac (Barcelona, España).
- **Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )** (HPLC grade 99,9 %) procedente de los laboratorios Scan (Irlanda).
- **Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )** (HPLC grade 99 %) procedente de los laboratorios Panreac-Química (Barcelona, España).
- **Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )** procedente de los laboratorios Sigma-Aldrich (Alemania).
- **Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )** procedente de los laboratorios Sigma-Aldrich (Alemania).

## 3.2.- MÉTODOS

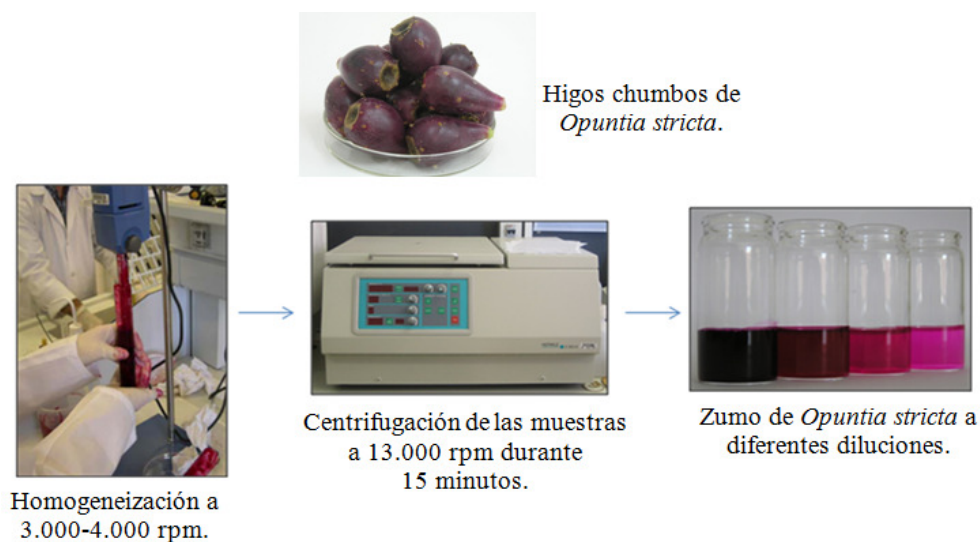
### 3.2.1.- Método de obtención del zumo de *Opuntia stricta*

El zumo del higo chumbo de la especie *Opuntia stricta* es el único zumo de frutas rojas estudiado que no se comercializa, por lo que se obtuvo en el laboratorio del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT.

Para su obtención se recolectaron frutos maduros de la especie *Opuntia stricta* (Haw) y se almacenaron a -20 °C.

Para la preparación del zumo, los frutos de *Opuntia stricta* se descongelaron a temperatura ambiente durante unos 30 minutos, se homogeneizaron con el equipo Ultraturrax modelo Ika Labortechnik T-25 basic (Alemania), a una velocidad de 3.000 a 4.000 rpm.

El zumo se clarificó por centrifugación en una centrífuga refrigerada modelo Hermle Z-383-K, Wehingen (Alemania) a 13.000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura de 10 °C. Con este proceso se eliminaron los restos vegetales insolubles y semillas que quedan en el precipitado que se desechó. La Figura 3.7 muestra la secuencia de la obtención de este zumo.



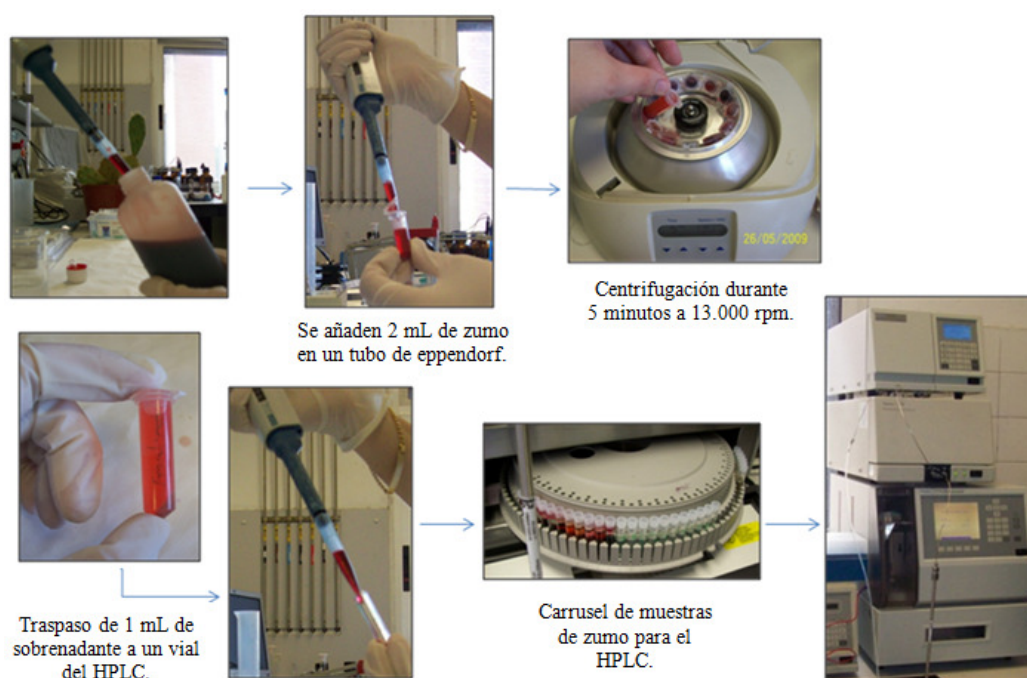
**Figura 3.7:** Proceso de obtención del zumo de *Opuntia stricta* en el laboratorio.



### 3.2.2.- Preparación de las muestras de zumos de frutas para su análisis

Los zumos concentrados, zumos y purés de frutas se conservaron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para su análisis, se dejaron descongelar completamente a temperatura ambiente. Una vez descongelados se homogeneizaron. El tratamiento que se aplicó a los distintos formatos de zumos de frutas analizados fue el siguiente:

- **Zumos concentrados:** estos zumos (60,2-70,7 °Brix) se diluyeron 5 veces en agua para obtener un valor similar de grados Brix al de los zumos no procedentes de concentrado. A continuación, se filtraron a través de filtros de nylon de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  (Teknokroma, Barcelona, España) para eliminar las partículas que pudieran quedar retenidas en la columna cromatográfica.
- **Purés de frutas:** con un valor de 6,8-11 °Brix, los purés de frutas no se diluyeron sino que se clarificaron. Una vez descongelados, 2 mL de muestra se centrifugaron en una centrífuga Z383K Hermle (Wehingen, Germany), a 13.000 rpm durante 5 minutos a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido en la centrifugación se filtró a través de filtros de nylon de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  (Teknokroma, Barcelona, España) antes de ser analizado. La Figura 3.8 muestra el proceso de preparación de los purés de frutas para su análisis.
- **Zumos:** se filtraron directamente con filtros de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  para analizarlos sin centrifugar ni diluir. El néctar de plátano siguió el mismo tratamiento.



**Figura 3.8:** Preparación de las muestras en forma de purés para su análisis.

### **3.2.3.- Preparación de los smoothies para su análisis**

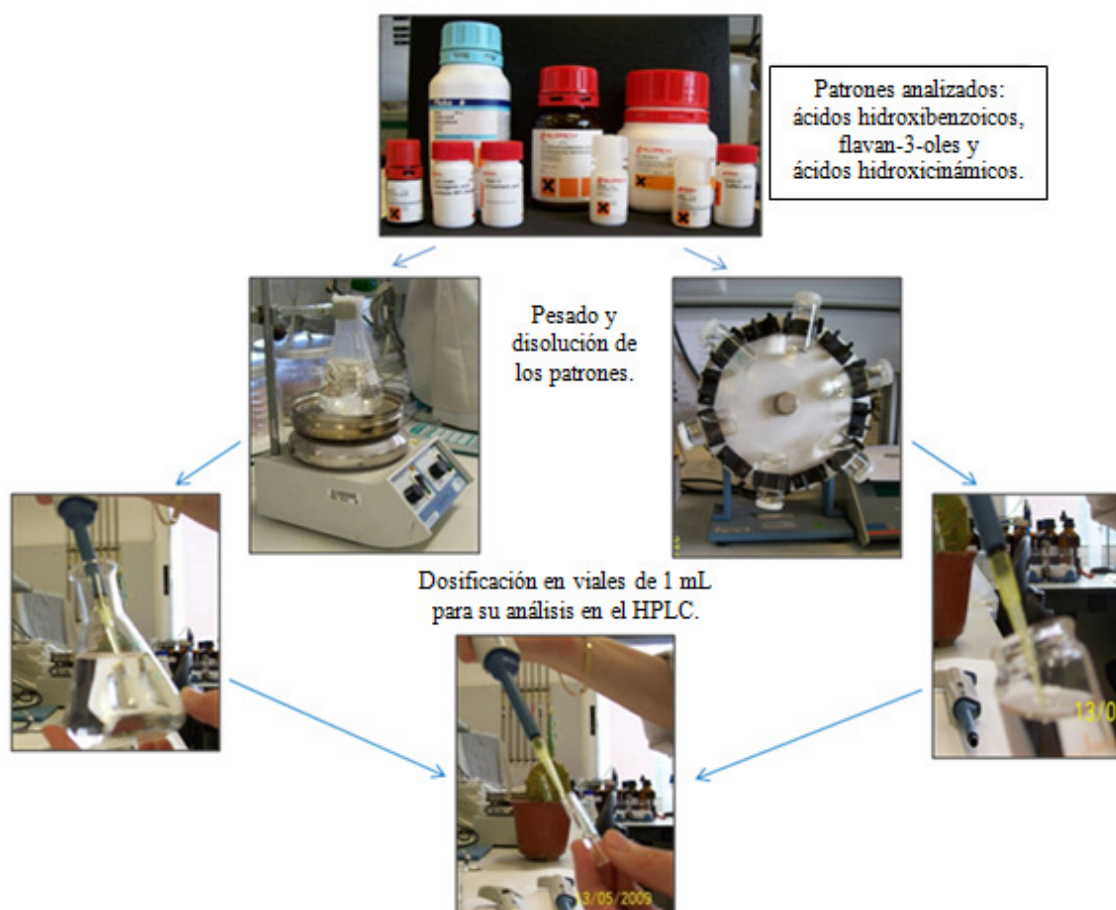
Las muestras se clarificaron por centrifugación durante una hora a 13.000 r.p.m. en una centrifuga Z383K Hermle (Wehingen, Germany) a 10 °C, posteriormente se analizaron los sobrenadantes una vez filtrados con filtros de 0,45 µm (Teknokroma, Barcelona, España).

### **3.2.4.- Preparación de los colorantes rojos para su análisis**

Los colorantes rojos estudiados en formato polvo, se disolvieron en agua a una concentración de análisis de 0,5 mg/mL. Posteriormente se filtraron en un filtro de 0,45 µm (Teknokroma, Barcelona, España) para su análisis por HPLC.

### 3.2.5- Preparación de patrones de polifenoles

Atendiendo a la solubilidad de los patrones de polifenoles que se van a analizar, todos ellos se prepararon a una concentración de 0,05 mg/mL en agua, excepto el ácido elágico, los flavan-3-oles, las flavanonas y las dihidrochalconas que se disolvieron en metanol a la misma concentración. Las cantidades correspondientes de cada compuesto se pesaron en una balanza de precisión, se disolvieron con ayuda de un agitador magnético o giratorio y se llevaron al volumen correspondiente con ayuda de un matraz aforado de volumen 50 mL. Tras la disolución, se dosificaron para su análisis. La Figura 3.9 muestra el proceso de preparación de los patrones.



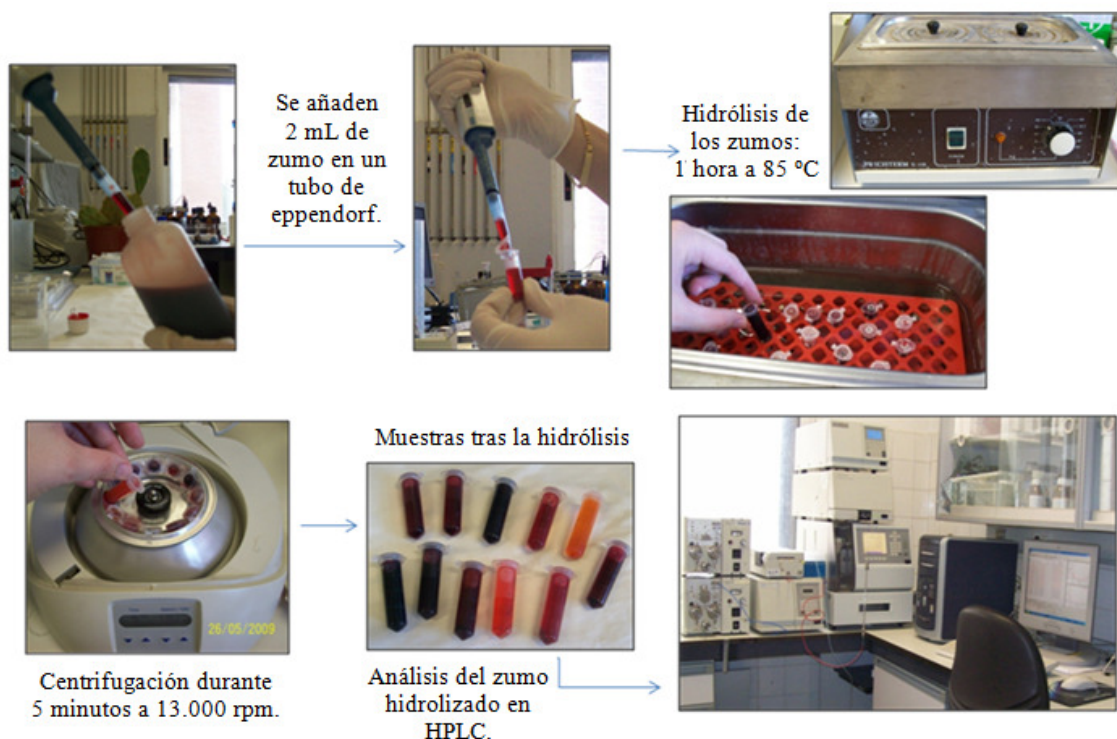
**Figura 3.9:** Preparación de los patrones de polifenoles para su análisis en el HPLC.

### 3.2.6.- Método de hidrólisis ácida de los ácidos hidroxycinámicos esterificados

Diferentes zumos y purés de frutas rojas fueron sometidas a hidrólisis ácida, para ayudar a identificar algunos de los compuestos presentes en los zumos.

El protocolo empleado fue el siguiente:

- En un tubo de eppendorf de 2 mL se añadieron: 400  $\mu$ L de zumo concentrado, 400  $\mu$ L de ácido ascórbico a una concentración de 8 g/L, 400  $\mu$ L de ácido clorhídrico 6 M y 800  $\mu$ L de agua destilada.
- Los tubos de eppendorf con las muestras se introdujeron en un baño termostático controlado a 85 °C de temperatura durante una hora.
- Transcurrida una hora las muestras se enfriaron y se centrifugaron en una centrífuga de eppendorf a 13.000 rpm durante 5 minutos para obtener el sobrenadante, que tras ser filtrado se analizó por HPLC.



**Figura 3.10:** Proceso seguido en la hidrólisis ácida.

### **3.2.7.- Determinación de pH**

El pH es el parámetro que permite conocer la concentración de protones ( $H^+$ ) existentes en un medio. Para su determinación se utilizó un pH-metro GLP-22 de la casa comercial Crison (Barcelona, España) y el cual nos permite obtener medidas con una precisión de 0,001 unidades de pH.

### **3.2.8.- Determinación de sólidos solubles totales**

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un zumo. Para medir estos sólidos solubles se utilizó un refractómetro digital de la casa comercial Atago (Japón). Para su empleo se coloca una pequeña cantidad de muestra de los zumos a analizar (0,3 mL) en el campo del refractómetro y tras varios segundos nos indica la cantidad de sólidos solubles de la muestra midiendo en un rango de 0 a 85 °Brix.

### **3.2.9.- Método de medida por espectrofotometría**

Los análisis de espectrofotometría se llevan a cabo con un espectrofotómetro modelo 8453 UV-Visible de la casa comercial Agilent (Waldbronn, Alemania) y en el que se emplean cubetas de cuarzo de 3 mL para su medida.

Los barridos de absorbancia se realizan en un rango de longitudes de onda entre 200 y 800 nm.

### **3.2.10.- Método de medida de espectros de absorbancia**

Los espectros de absorbancia de los patrones estudiados se obtuvieron con el PDA (Photodiode array detector) implantado en el HPLC. Para ello, las muestras se prepararon de la misma forma que para su análisis en el HPLC.

### **3.2.11.- Método de medida de espectros de fluorescencia**

El detector de fluorescencia es entre 10 y 1.000 veces más sensible que el detector de UV, además la detección por fluorescencia es un método específico y selectivo, por lo que destaca entre los detectores ópticos. Por este motivo nos planteamos implementar dicho detector en el análisis por HPLC para mejorar la detección e identificación de los compuestos.

Los espectros de fluorescencia se realizaron con el espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Tokio, Japón) mostrado en la Figura 3.11, para determinar los valores de excitación y emisión de cada uno de los patrones estudiados.

El procedimiento seguido se basó en realizar un espectro de excitación a una longitud de onda de emisión fija de 280 nm, obteniendo así el valor de longitud de onda máximo de excitación del compuesto. A continuación, se realizó un nuevo espectro, en este caso de emisión, manteniendo fija la longitud de onda máxima de excitación obtenida anteriormente para así poder determinar la longitud de onda máxima de emisión.



**Figura 3.11:** Fluorímetro Hitachi F4500.

### **3.2.12.- Método IFU nº 71 de 1998**

El equipo de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) empleado en la primera parte de nuestros análisis (Capítulo de resultados 4.1) fue un HPLC de Waters (Milford, MA, USA) compuesto por dos bombas M-510, un detector de fotodiodos (PDA) M-996, un detector de fluorescencia modelo W-2475 y un inyector automático modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA) (Figura 3.12).

La columna empleada fue una Zorbax SB-C18 (80 Å poro, 180 m<sup>2</sup>/g, carbon load: 10 %, estable a pH < 2) con un tamaño de partícula de 5 µm y de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de la casa comercial Agilent (USA). El análisis de datos obtenidos por el HPLC se realizó con un sistema de datos Millenium<sup>32</sup> 2010.





**Figura 3.12:** Equipo de HPLC utilizado en los análisis.

Las condiciones de análisis por HPLC con detector de fotodiodos y detector de fluorescencia simultáneamente fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua ultrapura/Ácido fórmico (90v/10v).
- Fase móvil B: Acetonitrilo/Ácido fórmico (90v/10v).
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura de análisis: 25 °C.
- Volumen de inyección: 10 µL de cada muestra de frutos rojos.
- Detección en línea con el detector de fotodiodos y el detector de fluorescencia.
- El gradiente de elución según el método IFU n° 71 se muestra en la Tabla 3.8:

**Tabla 3.8:** Gradiente de elución según el método IFU n° 71.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	93,7	6,3
1	93,7	6,3
26	84,2	15,8
35	47,4	52,6
38	47,4	52,6
43	93,7	6,3
46	93,7	6,3

### 3.2.13.- Método UHPLC-PDA-Fluorescencia

Para la segunda parte de nuestro trabajo (Capítulo 4, apartados 4.2-4.5), los análisis se realizaron con un UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) de Agilent Technologies (Alemania), compuesto por una bomba binaria (Binary Pump serie 1200), un detector de fotodiodos (PDA) con detección de longitud de onda múltiple (G1315C/D y G1365C/D serie 1200), un compartimento de termostatzado de la columna, un detector de fluorescencia (G1321A) y un inyector automático preparativo y estándar. Todos ellos de la casa Agilent (Alemania). Una imagen del equipo se muestra en la Figura 3.13.



**Figura 3.13:** UHPLC Agilent.

El análisis de datos obtenidos por UHPLC se realizó con el sistema de datos de Agilent ChemStation for LC & LC/MS Systems.

Se emplearon tres columnas de análisis mostradas en la Figura 3.14, con una pre-columna Agilent (USA). Las columnas utilizadas fueron:

- Zorbax SB-C18, 164'1 bar, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno. Casa Agilent (USA).
- Zorbax SB-C18, 164'1 bar, tamaño de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$  y 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno. Casa Agilent (USA).
- Zorbax SB-C18, 281'2 bar, tamaño de partícula de 1,8  $\mu\text{m}$  y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno. Casa Agilent (USA).



**Figura 3.14:** Diferentes columnas de análisis utilizadas.



La modificación del método que proponemos se basa en el empleo de un UHPLC con detección de PDA y fluorescencia simultáneamente. Ha sido modificado a partir del método IFU n° 71 de 1998 no solo para obtener el perfil de antocianos sino también el perfil de otros grupos de polifenoles.

Las condiciones óptimas de análisis de este método por UHPLC-PDA-Fluorescencia fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua ultrapura/Ácido trifluoroacético (99,5v/0,5v).
- Fase móvil B: Agua ultrapura/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5v/50v/0,5v).
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Columna cromatográfica: Zorbax SB-C18 con un tamaño de partícula de 1,8  $\mu\text{m}$  y de 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de la casa Agilent (USA).
- Volumen de inyección: 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra.
- Detección: por PDA a unas longitudes de onda de 260, 280, 320, 360 y 520 nm, y por fluorescencia a unas condiciones de excitación de 290 nm y emisión de 350 nm.
- El gradiente de elución se muestra en la Tabla 3.9:

**Tabla 3.9:** Gradiente de elución del método UHPLC-PDA-Fluorescencia.

<b>Tiempo</b> (minutos)	<b>Fase móvil A</b> (%)	<b>Fase móvil B</b> (%)
0	92	8
1,2	92	8
14	82	18
28	68	32
34	44,4	60
38,8	44,4	100
39,2	92	100
40	92	8

Como estándar interno se empleó pelargonidina 3-O-glucósido, por lo que se realizaron los análisis de cada muestra con y sin adición del estándar interno. En el primer análisis se realizó la inyección simultánea de 2  $\mu$ L de muestra de zumo y 2  $\mu$ L del patrón estándar (pelargonidina 3-O-glucósido) a una concentración de 0,05 mg/mL con la finalidad de obtener el tiempo de retención relativo de cada uno de los compuestos respecto al del patrón estándar. En un segundo análisis, solo se inyectaron 2  $\mu$ L de muestra. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y su tiempo de retención y área de pico fue obtenida como la media de todos los análisis.

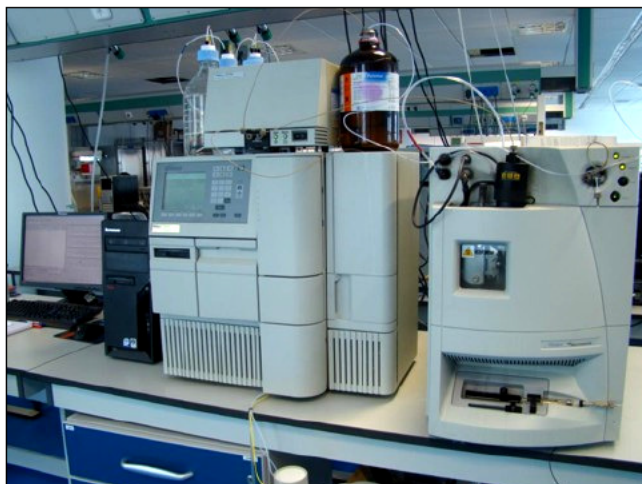
Los diferentes compuestos fenólicos se identificaron en el cromatograma según el tiempo de retención de los compuestos puros, las características de UV-Visible o espectros de fluorescencia, su orden de elución y la comparación con los datos de la bibliografía.

Los polifenoles se clasificaron en distintos grupos seleccionando un compuesto como estándar dentro de cada grupo, la cuantificación se realizó por comparación entre los valores de área obtenidos para los componentes de cada zumo de fruta analizado y el área del patrón seleccionado como estándar para cada grupo del polifenoles. Así, los cálculos de Polifenoles Individuales Totales (Total Individual Polyphenol, TIP) se realizó de la siguiente manera: se sumaron las áreas que corresponden a cada compuesto dentro de cada uno de los grupos de polifenoles en su longitud de onda óptima, y este valor se usó para la cuantificación con la curva de la calibración realizada con el polifenol de referencia de cada grupo. Los valores se expresaron en mg/100 mL de zumo de fruta.

### 3.2.14.- Método HPLC-MS-PDA

Para confirmar la identificación de algunos compuestos se empleó un HPLC-MS (High-Performance Liquid Chromatography-Mass detector) de Waters Alliance 2695 (Milford, MA, USA), compuesto por una bomba cuaternaria de flujo variable con un volumen muerto inferior a 650  $\mu$ L, un horno termostatzador de la columna, inyector automático, detector de UV-VIS de fotodiodos en serie (modelo 2996) y un detector de espectrometría de masas ZQ 4000. (Figura 3.15) La columna empleada fue una Zorbax SB-C18 de un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de la casa Agilent (USA).

El análisis de datos obtenidos por el HPLC-MS se realizó con el sistema de datos Empower 2002.



**Figura 3.15:** Equipo de HPLC-MS de la casa comercial Waters.

Las condiciones de análisis de este método por HPLC-MS fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua ultrapura/Ácido trifluoroacético (99,5v/0,5v).
- Fase móvil B: Agua ultrapura/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5v/50v/0,5v).
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Volumen de inyección: 10  $\mu$ L
- Datos para el espectrómetro de masas: ESI (+)
- Capilaridad: 3500 V
- SCAN: 50-1000 m/z

- N<sub>2</sub>: 10 L/min
- Voltaje de cono: 15 y 45 eV
- Datos para el PDA: 240-550 nm
- Gradiente de elución (Tabla 3.10):

**Tabla 3.10:** Gradiente de elución del método HPLC-MS.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	92	8
3,3	82	18
37,3	68	32
74,6	40	60
90,6	0	100
103,4	0	100
104,5	92	8
107,2	92	8

### 3.2.15.- Método de Folin-Ciocalteu

La determinación de compuestos fenólicos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu según el método descrito por Skerget *et al.*, (2005). Se emplearon 0,5 mL de muestra de zumo al que se añadieron 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido por 10 veces en agua.

Tras un intervalo de tiempo de 0,5 a 8 min, se añadieron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L). La muestra se incubó durante 5 min a 50 °C y se enfrió rápidamente. Se midió la absorbancia a 760 nm frente a un blanco con agua. Las medidas cuantitativas se refieren a una recta patrón realizada con ácido gálico.

El valor de polifenoles total (TP) se expresó en mg GAE (Equivalentes de Ácido Gálico) por 100 mL de zumo. El ácido gálico se seleccionó como referencia de la medida de polifenoles totales porque se encuentra a alta concentración en frutas y verduras y por ser el habitualmente utilizado en la determinación de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

La vitamina C da positivo con el reactivo de Folin-Ciocalteu por lo que el valor de TP fue recalculado para cada zumo restándole la concentración de ácido ascórbico (vitamina C). El ácido ascórbico de cada zumo de fruta fue determinado por el método de UHPLC-PDA-Fluorescencia detectado a la longitud de onda de 243 nm y cuantificado con un patrón comercial de ácido ascórbico.

### 3.2.16.- Parámetros cromatográficos

En la optimización del método de análisis por HPLC se han estudiado los siguientes parámetros cromatográficos (Hernández-Pérez, 2005).

- **Factor de capacidad o de retención ( $k'$ ):** parámetro útil para comparar los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos por diferentes equipos de HPLC ya que incluye pequeñas variaciones de flujo y las dimensiones de la columna. Es el tiempo que el soluto pasa en contacto con la fase estacionaria con respecto al que pasa en la fase móvil.

$$k' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

- **Poder de separación o Selectividad ( $\alpha$ ):** es la habilidad que posee el sistema cromatográfico para distinguir químicamente entre los componentes de la muestra. A mayor valor de selectividad, mayor separación en los ápices de los picos. Determina las separaciones entre picos. Si  $\alpha = 1$  representa tiempos de retención iguales lo que indica que no existe separación. A mayor valor, la columna es más selectiva y tiene una mejor resolución.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

- **Resolución ( $R_s$ ):** medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos. Un valor de resolución de 1 indica que la resolución es del 90 %, mientras que un valor de 1,5 o mayor entre dos o más picos asegura que los componentes de la mezcla se separan adecuadamente hasta la línea base. La resolución se calcula utilizando la separación de dos picos en términos del ancho promedio del pico en la base ( $t_{R2} > t_{R1}$ ). La resolución se ve afectada por la selectividad (factor de separación) eficiencia y retención (factor de capacidad).

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$





---

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1.- “Determinación del perfil de antocianos, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en zumos de frutas rojas por HPLC-PDA-FLUORESCENCIA”**

En el análisis de los zumos de frutas la composición de los polifenoles se determina a partir del perfil de picos que dan los compuestos de un cromatograma obtenidos del análisis por HPLC. Este perfil de compuestos es característico de cada fruta y permite establecer su “huella dactilar”. Se puede conocer así la procedencia de un zumo y si existen adulteraciones o errores no intencionados que hayan tenido lugar durante el procesado.

En la primera parte de este trabajo se analizan los zumos de once frutas rojas por el método IFU nº 71 de 1998. Este método es el propuesto por la IFU (International Federation of Fruit Juice Produce) para el análisis del perfil de antocianos en los zumos de frutas. Como innovación al método este trabajo se plantea la detección sucesiva por PDA, habitual del método IFU nº 71, y por fluorescencia con la intención de mejorar el análisis de los polifenoles presentes en los zumos de fruta teniendo en cuenta que muchos compuestos fenólicos presentan fluorescencia y que, para compuestos fluorescentes, este sistema de detección es más sensible que el UV-Visible. Se pretende así detectar un mayor número de compuestos y con mayor definición en un mismo análisis con detección simultánea de PDA-Fluorescencia para determinar antocianos, betacianinas, colorantes rojos artificiales y naturales, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en las frutas rojas, zumos vegetales o bebidas refrescantes de color rojo.

Se seleccionaron once zumos de fruta y vegetales de color rojo. Nueve zumos de frutas rojas (fresa, frambuesa, mirtilo, arándano americano y europeo, grosella negra, cereza, mora y uva tinta) y un zumo vegetal de zanahoria morada se seleccionaron por su contenido en antocianos, mientras que el zumo del higo chumbo *Opuntia stricta* se seleccionó por deber su coloración a las betacianinas.



Una mezcla de colorantes rojos artificiales y naturales empleados en la industria alimentaria (carmoisina, amaranto, ponceau 4R, eritrosina, rojo 2G, rojo allura y carmín cochinilla) disueltos en agua se aplicaron como disolución estándar para detectar e identificar la presencia de colorantes en bebidas refrescantes de color rojo o zumos de frutas rojas, donde se han podido adicionar como adulterantes.

Los resultados obtenidos del análisis de HPLC se muestran por grupos según la longitud de onda característica de los diferentes compuestos. Primero se detectaron los antocianos, betacianinas y colorantes rojos a una absorbancia de 520 nm. Después, los ácidos hidroxicinámicos a una longitud de onda de 320 nm y, finalmente, los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos a una absorbancia de 260 nm. Además, los ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos también fueron detectados por fluorescencia.

#### **4.1.1.- Optimización de las condiciones de detección y análisis**

Para optimizar la detección del método se seleccionaron una serie de compuestos utilizados como patrones correspondientes a distintos grupos de polifenoles: ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. La elección de estos grupos se debe a su carácter fluorescente, según se describe en la bibliografía consultada (Valls *et al.*, 2009; Naczki & Shahidi, 2006; Robards & Antolovich, 1997). Los polifenoles seleccionados como patrones fueron los ácidos: gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, vanílico, sirínico y elágico como ácidos hidroxibenzoicos; ácido clorogénico, cafeico, *p*-Cumárico, ferúlico y sinápico como ácidos hidroxicinámicos; (+)-catequina y (-)-epicatequina como flavan-3-oles monoméricos; y resveratrol como estilbeno. Se analizaron por HPLC con detección por PDA y fluorescencia, obteniendo los espectros correspondientes.

##### **- Espectros de absorbancia**

Los espectros de absorbancia obtenidos para los patrones de ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos estudiados, se muestran en las Figuras 4.1 y 4.2 y se determinaron con el detector de fotodiodos (PDA) tras su separación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

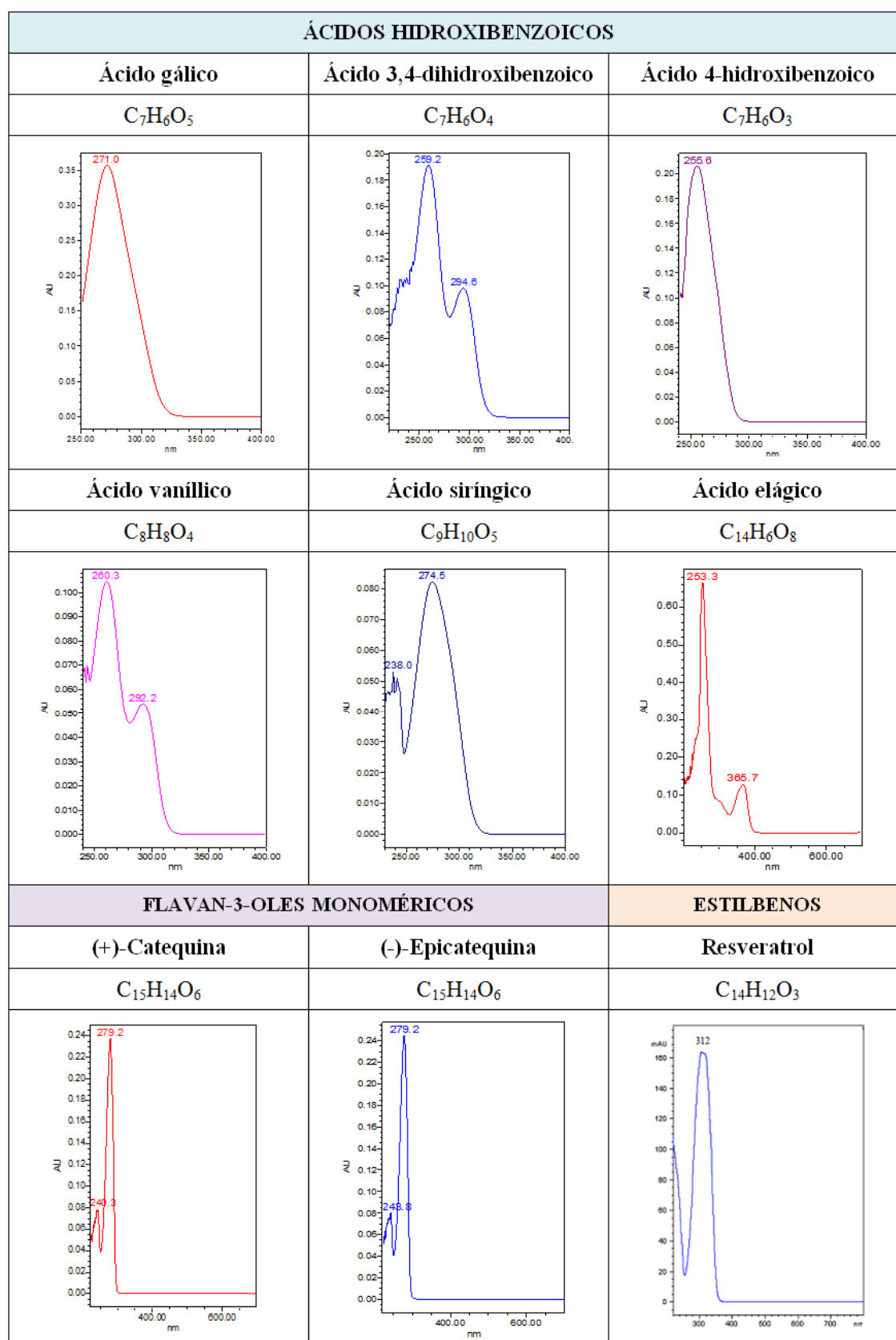


Figura 4.1: Espectros individuales de absorbancia y fórmula química condensada de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos.

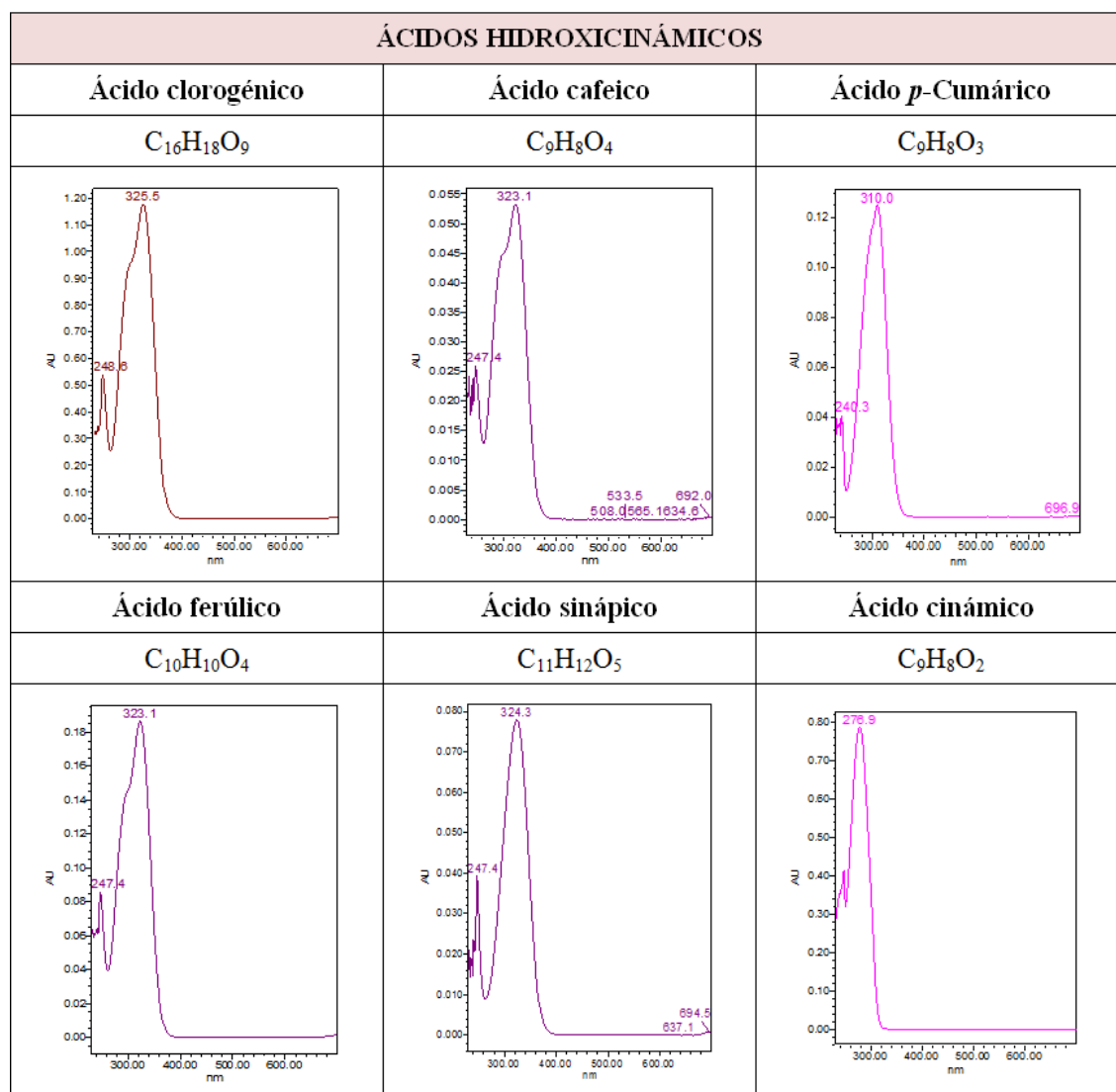


Figura 4.2: Espectros individuales de absorbancia y fórmula química condensada de los ácidos hidroxicinámicos.

Como era de esperar por su estructura química con presencia de anillos aromáticos, todos los compuestos estudiados absorben en ultravioleta con máximos de absorbancia que están entre los 260 y 360 nm.

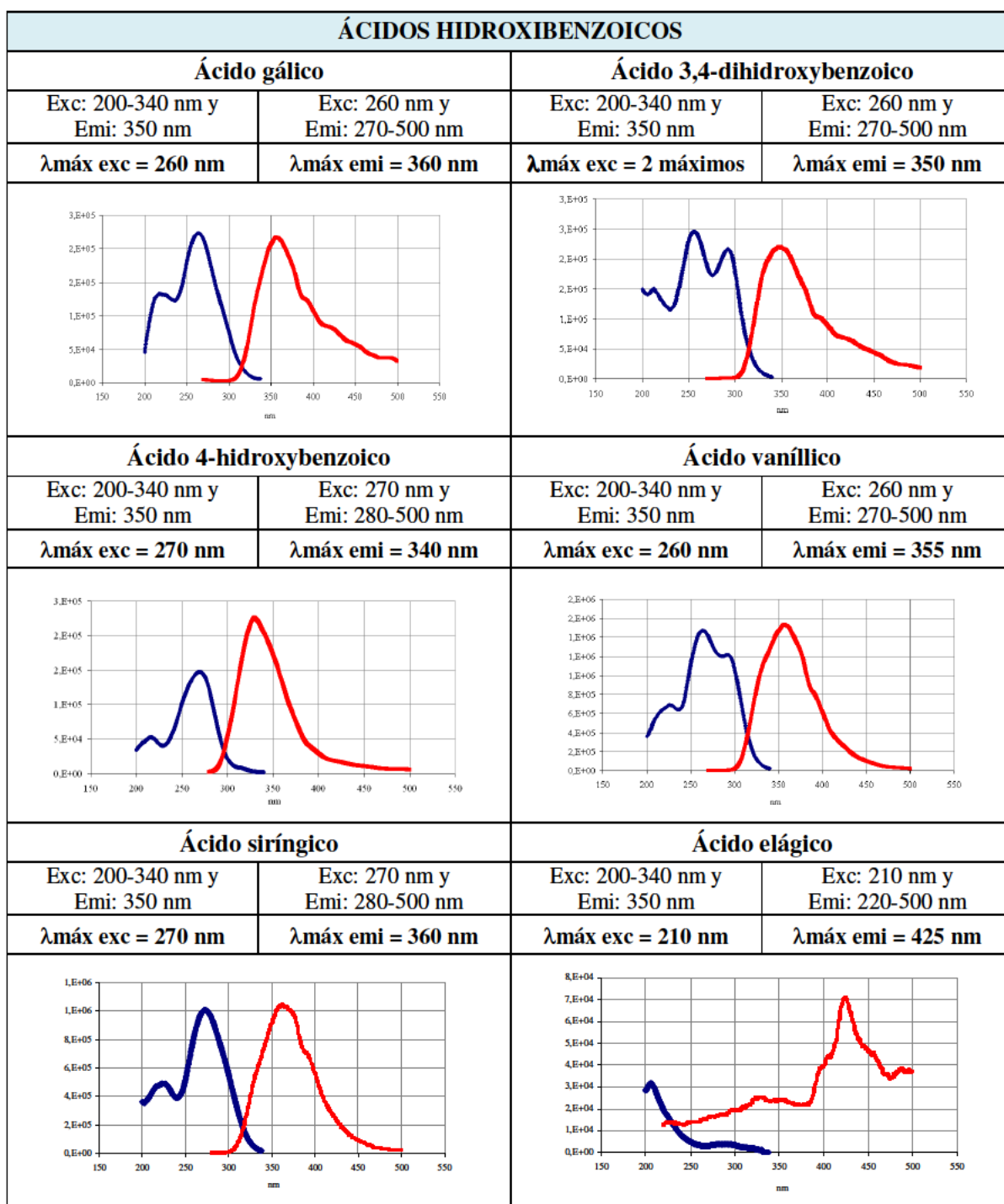
Los espectros de estos patrones se utilizaron en la identificación posterior de los polifenoles presentes en los zumos analizados. Cabe destacar que compuestos fenólicos como los ácidos gálico, 4-hidroxibenzoico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, resveratrol, ácidos sinápico y cinámico poseen un espectro de absorción caracterizado por tener un solo pico bien definido, mientras que el resto de compuestos presentan hombros (ácidos clorogénico, cafeico, *p*-Cumárico o ferúlico) o doble pico de absorción (ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, sirínico, vanílico o elágico).

### **- Espectros de fluorescencia**

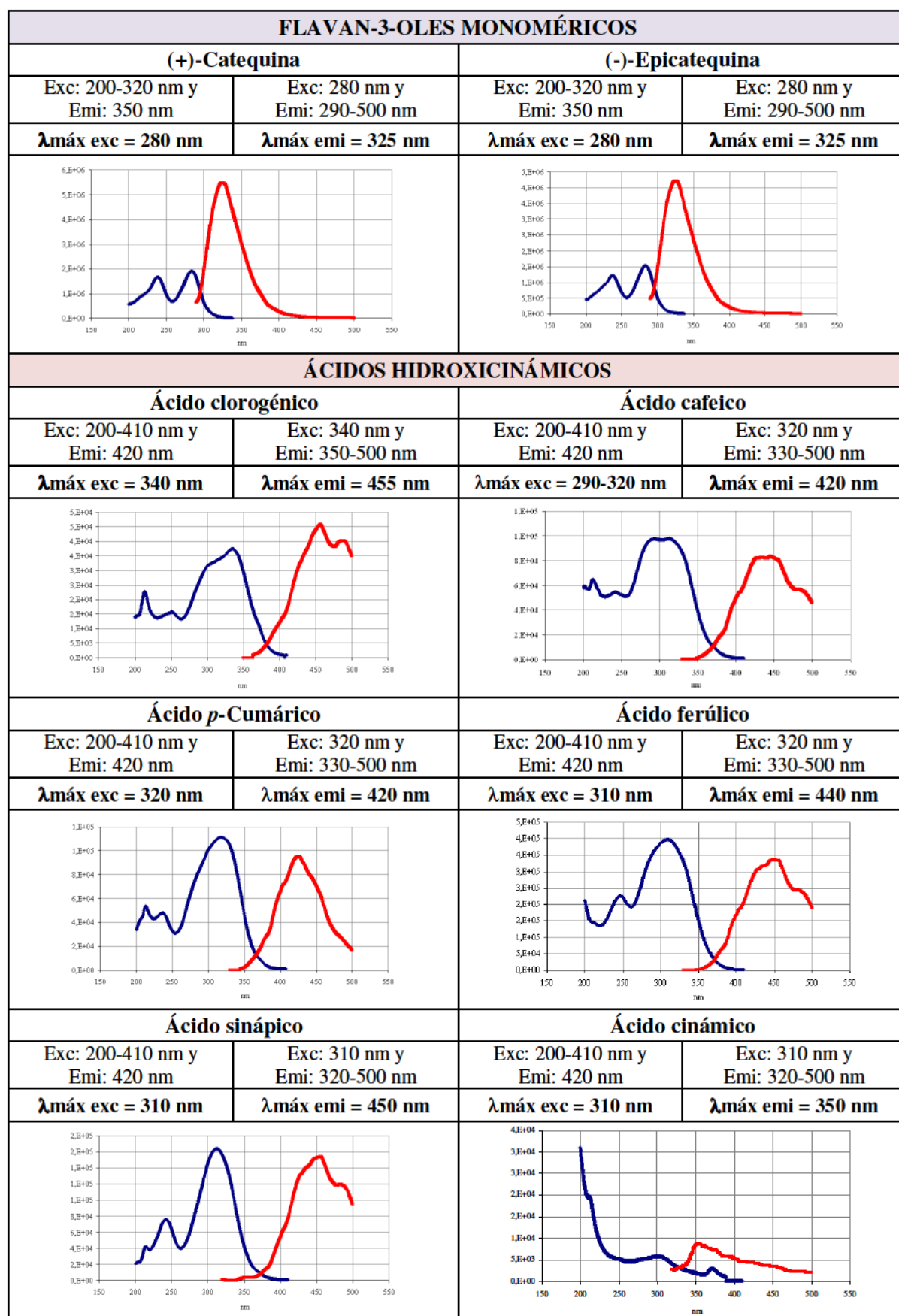
Ante el estudio bibliográfico donde se indica que estos patrones seleccionados poseen fluorescencia (Valls *et al.*, 2009; Naczk & Shahidi, 2006; Robards & Antolovich, 1997), se realizaron sus espectros por fluorescencia que se muestran en las Figuras 4.3 y 4.4 donde la línea azul representa el espectro de excitación y la línea roja el espectro de emisión. Dichas determinaciones se realizaron con un fluorímetro tal y como se explica en el Capítulo 3 de materiales y métodos con la finalidad de obtener las máximas longitudes de onda de emisión y excitación de cada compuesto.

El procedimiento a seguir para obtener las medidas de los espectros de fluorescencia se basó en realizar un espectro de excitación a una longitud de onda de emisión fija y, posteriormente, se obtuvo el valor máximo de longitud de onda de excitación del compuesto. A continuación, se realizó un nuevo espectro, en este caso de emisión, manteniendo fija la longitud de onda máxima de excitación obtenida anteriormente para así poder determinar la longitud de onda máxima de emisión.

El rango de excitación que se aplicó a los compuestos analizados que fue de 200 a 340 nm con una emisión fija de 350 nm para los ácidos hidroxibenzoicos, de 200 a 320 nm con una emisión fija de 350 nm para los flavan-3-oles y de 200 a 410 nm con una emisión fija de 420 nm para los ácidos hidroxicinámicos. Con este barrido se obtuvo el valor de longitud de onda máxima de cada compuesto en excitación, el cuál se fijó en el siguiente análisis para obtener la máxima longitud de onda en emisión.



**Figura 4.3:** Espectros de fluorescencia y longitudes de onda máximas de excitación y emisión de los ácidos hidroxibenzoicos. La línea azul representa el espectro de excitación y la línea roja el espectro de emisión.



**Figura 4.4:** Espectros de fluorescencia y longitudes de onda máximas de excitación y emisión de los flavan-3-oles monoméricos y ácidos hidroxicinámicos. La línea azul representa el espectro de excitación y la línea roja el espectro de emisión.

Se observa como en la mayoría de los espectros se identifican bastante bien las líneas de excitación y emisión siendo, en general, bastante simétricas entre sí.

En la Figura 4.3 cabe destacar, por ejemplo, el espectro de fluorescencia del ácido 3,4-dihidroxibenzoico que posee dos máximos de excitación bien definidos, uno a 260 y otro a 290 nm, en este caso, tomamos como longitud de onda máxima a fijar para el valor de la excitación 260 nm ya que es el pico más elevado. Otro ejemplo es el ácido vanílico que muestra un hombro en su espectro en torno a los 290 nm. El resto de ácidos hidroxibenzoicos analizados por fluorescencia mostraron un solo pico como valor máximo de emisión o de excitación. En este grupo el ácido elágico tiene un espectro que no está tan definido como en el resto de compuestos y sus máximos de excitación y emisión se encuentran distantes entre sí con respecto al resto de patrones en los que la distancia entre máximos de excitación y emisión está más próxima.

En la Figura 4.4 también se aprecia como los flavan-3-oles monoméricos, (+)-catequina y (-)-epicatequina, al igual que ocurre con el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, poseen dos máximos de excitación a unas longitudes de onda de 240 y 280 nm. Además, su diferencia con respecto al espectro de emisión está bien marcada siendo éste último bastante elevado y característico de estos compuestos lo cual indica que estos compuestos se detectan mejor en fluorescencia que en absorbancia. Esta Figura 4.4 también muestra los espectros de fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos donde todos ellos están bien definidos a excepción del ácido cinámico cuyo espectro de excitación no está claramente definido a diferencia del de emisión que tiene un valor de 350 nm.

Los valores de excitación y emisión obtenidos se utilizaron para fijar las condiciones de detección por fluorescencia en el análisis de zumos.

En la Tabla 4.1 se resumen las características espectrofotométricas obtenidas para los polifenoles estudiados con sus valores máximos de absorbancia y fluorescencia.

**Tabla 4.1:** Características espectrofotométricas de los patrones estudiados.

Polifenoles	Absorbancia ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (nm)	Fluorescencia ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (nm)	
		Excitación	Emisión
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS			
Ácido gálico	271	260	360
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	259 y 294	290	350
Ácido 4-hidroxibenzoico	256	260	340
Ácido vanílico	260 y 292	260	355
Ácido sirínico	238 y 274	270	360
Ácido elágico	253 y 366	210	425
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS			
Ácido clorogénico	249 y 325	340	455
Ácido cafeico	247 y 323	310	440
Ácido <i>p</i> -Cumárico	241 y 310	320	420
Ácido ferúlico	247 y 323	310	445
Ácido sinápico	247 y 324	310	450
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS			
(+)-Catequina	280	280	325
(-)-Epicatequina	280	280	325
ESTILBENOS			
Resveratrol	312	274	360

Tras analizar los espectros de absorbancia y fluorescencia de cada uno de los patrones individuales, éstos se clasificaron en dos grupos de compuestos para su estudio posterior: un grupo para la detección de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos (grupo 1) y otro para la detección de los ácidos hidroxicinámicos (grupo 2). Para cada grupo se seleccionaron los valores de longitud de onda máxima en absorbancia y fluorescencia:

- Grupo 1: absorbancia: 260 nm y fluorescencia:  $\lambda_{\text{exc}} = 290$  nm y  $\lambda_{\text{emi}} = 350$  nm
- Grupo 2: absorbancia: 320 nm y fluorescencia:  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm y  $\lambda_{\text{emi}} = 420$  nm

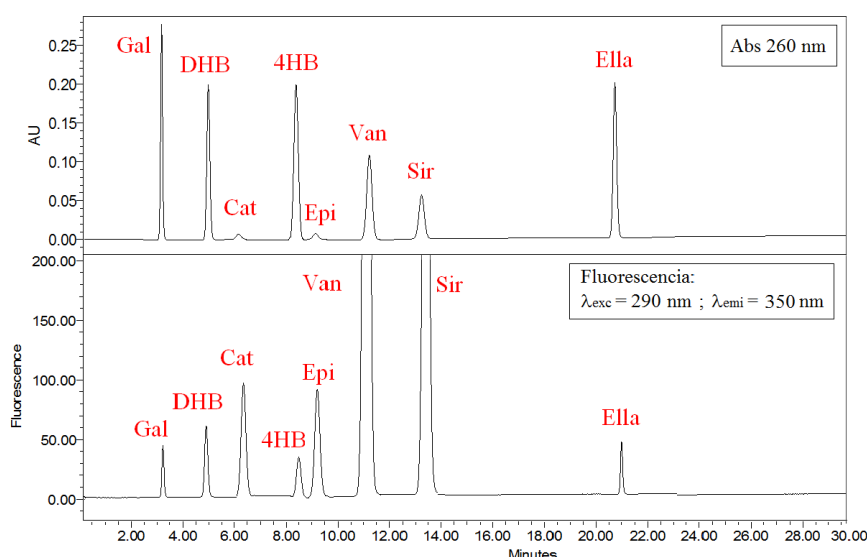
La finalidad de establecer solamente dos grupos de estudio se realizó para poder identificar, con tan solo dos inyecciones de muestra, estos grupos de polifenoles además de los antocianos que proporcionan la coloración roja.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al analizar estos dos grupos de compuestos. Para cada grupo, todos los compuestos analizados se disolvieron en una misma muestra.



▪ **Grupo 1: Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos**

Los patrones de este grupo 1 fueron los ácidos: gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, vanílico, sirínico, elágico, (+)-catequina, (-)-epicatequina y resveratrol. Se disolvieron en agua a una concentración final de 0,05 mg/mL, a excepción del ácido elágico que se disolvió en metanol debido a su baja solubilidad en agua. La Figura 4.5 muestra los cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC y detectados a una absorbancia de 260 nm y por fluorescencia a unas condiciones de excitación de 290 nm y emisión de 350 nm. La Tabla 4.2 muestra las abreviaturas y tiempos de retención de los compuestos analizados.



**Figura 4.5:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos detectados por absorbancia a 260 nm y por fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emi}} = 350 \text{ nm}$ .

**Tabla 4.2:** Abreviaturas y tiempos de retención de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos.

Identificación en el cromatograma	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Gal	Ácido gálico	3,4
DHB	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	4,4
Cat	(+)-Catequina	5,9
4HB	Ácido 4-hidroxibenzoico	8,3
Epi	(-)-Epicatequina	9,2
Van	Ácido vanílico	11,3
Sir	Ácido sirínico	13,3
Ella	Ácido elágico	21,1

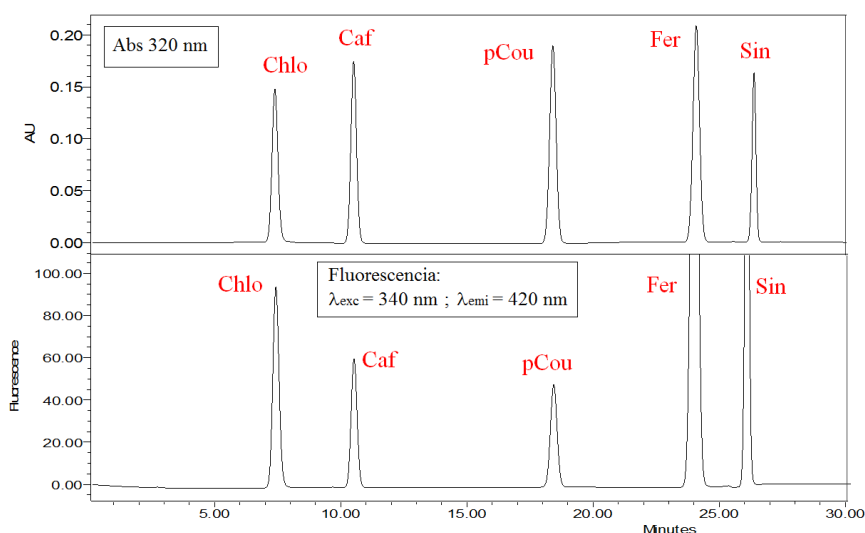
Comparando los cromatogramas obtenidos por absorbancia y por fluorescencia (Figura 4.5), podemos observar que en UV a 260 nm se detectan todos los compuestos analizados con una buena resolución, aunque los flavan-3-oles monoméricos ((+)-catequina y (-)-epicatequina) muestran una absorbancia muy baja dando picos muy pequeños.

Al observar estos mismos compuestos en el perfil de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}}$  290 nm y  $\lambda_{\text{emi}}$  350 nm), se logra mejorar sustancialmente la detección de estos dos flavan-3-oles monoméricos, así como la de los ácidos vanílico y sirínico. La señal más grande en fluorescencia de estos compuestos permite no solo una mejor detección, sino también una cuantificación más exacta. Además, como se puede observar los ácidos gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico y elágico se detectan mejor en el perfil de absorbancia que en el de fluorescencia. En este caso es la absorbancia la que permite una mejor detección y cuantificación.

Estos resultados revelan como la detección en línea por absorbancia y fluorescencia permiten, con una ligera modificación del método IFU n° 71 para antocianos, la correcta identificación y cuantificación de otros polifenoles que no son coloreados.

### ▪ Grupo 2: Ácidos hidroxicinámicos

Los patrones del grupo 2 fueron los ácidos: clorogénico, cafeico, *p*-Cumárico, ferúlico y sirínico. Se disolvieron en agua a una concentración final de 0,05 mg/mL. La Figura 4.6 muestra los cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC y detectados a una absorbancia de 320 nm y por fluorescencia a unas condiciones de excitación de 340 nm y emisión de 420 nm. La Tabla 4.3 muestra las abreviaturas y tiempos de retención de los compuestos analizados.



**Figura 4.6:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos detectados por absorbancia a 320 nm y por fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.

**Tabla 4.3:** Abreviaturas y tiempos de retención de ácidos hidroxicinámicos.

Identificación en el cromatograma	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Chlo	Ácido clorogénico	7,6
Caf	Ácido cafeico	10,7
<i>p</i> Cou	Ácido <i>p</i> -Cumárico	18,5
Fer	Ácido ferúlico	24,0
Sin	Ácido sinápico	26,4

Como se observa en la Figura 4.6, los cinco compuestos analizados se detectan bien, tanto por absorbancia como por fluorescencia, aunque por fluorescencia y bajo las condiciones establecidas se mejora la detección de los ácidos ferúlico y sinápico. Estos compuestos se cuantifican, por tanto, con mayor exactitud a partir del cromatograma de fluorescencia.

Como resumen, las condiciones óptimas establecidas para la detección de los polifenoles aplicando el método de análisis IFU n° 71 para la determinación de

antocianos más la implementación en su análisis del detector de fluorescencia, son las siguientes:

- Antocianos: absorbancia a 520 nm.
- Ácidos hidroxicinámicos: absorbancia a 320 nm y fluorescencia  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm y  $\lambda_{\text{emi}} = 420$  nm.
- Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos: absorbancia a 260 nm y fluorescencia  $\lambda_{\text{exc}} = 290$  nm y  $\lambda_{\text{emi}} = 350$  nm.

#### 4.1.2.- Perfil por HPLC de polifenoles en zumos de frutas rojas

Una vez optimizadas las condiciones de detección se procedió a obtener el perfil de estos polifenoles en diversas frutas. Se analizaron los polifenoles cuya detección se ha optimizado en el apartado anterior y, también, los antocianos.

Todas las frutas seleccionadas fueron frutas rojas cuyo empleo es habitual en la industria de zumos y bebidas de frutas. El principal motivo de la elección de frutas rojas se debe a su elevado contenido en polifenoles y al incremento de su consumo en el mercado debido, entre otros motivos, a los efectos beneficiosos de los polifenoles para la salud. Todas las frutas analizadas fueron suministradas por diversos fabricantes o proveedores de empresas de zumos, por lo que se trata de muestras de productos empleados en la industria para la elaboración de zumos y bebidas de frutas rojas.

Las once frutas rojas estudiadas han sido: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo y americano, grosella negra, cereza, uva tinta, mora, zanahoria morada y el higo chumbo *Opuntia stricta*. Se analizaron por HPLC con detección en línea de UV-Visible y fluorescencia en las condiciones de análisis anteriormente descritas. El objetivo ha sido analizar las frutas y obtener de los resultados información que permita autenticar el origen de un zumo de frutas rojas. Esta información será de gran utilidad para los fabricantes de bebidas y zumos.

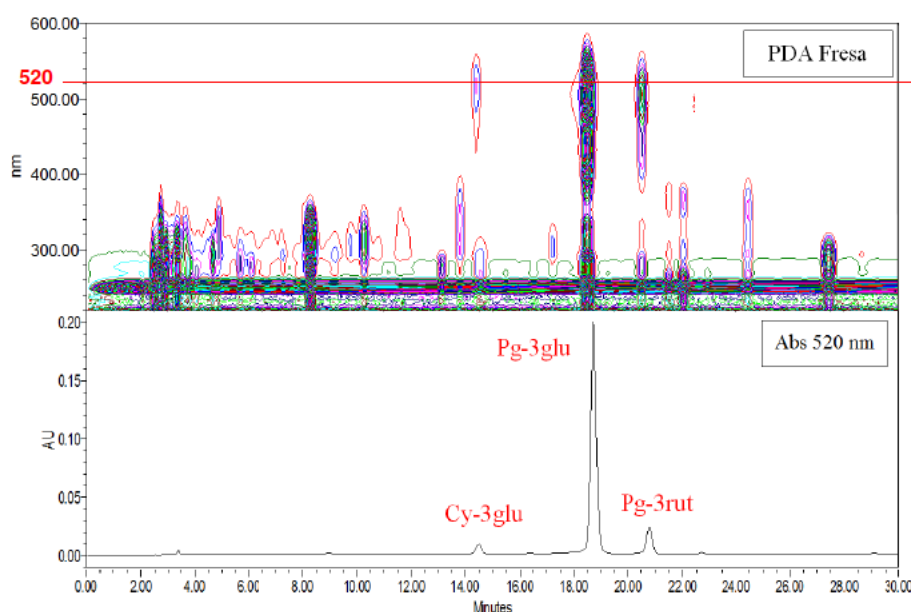
A continuación se presenta el análisis detallado de cada uno de los zumos analizados, más adelante, en las Tablas 4.56, 4.57 y 4.58 en las páginas 189, 190 y 193 se recoge una recopilación de todos los polifenoles identificados en las frutas rojas estudiadas correspondientes a diferentes grupos: antocianos, betacianinas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. Estas Tablas contienen una valiosa información para la autenticación de zumos.

#### 4.1.2.1.- FRESA (Strawberry; *Fragaria x ananassa*)

La muestra de fresa analizada ha sido un puré de 6,8 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Antocianos presentes en la fresa

El cromatograma general de la fresa obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm, se muestran en la Figura 4.7.



**Figura 4.7:** Cromatograma general y perfil de antocianos a 520 nm de la fresa.

La separación de los antocianos obtenida por HPLC (Figura 4.7) es muy eficiente, logrando separar por completo los tres antocianos principales presentes en la fresa. La pelargonidina 3-O-glucósido se ha identificado por comparación con un patrón comercial, mientras que cianidin 3-O-glucósido y pelargonidina 3-O-rutinósido se han identificado por comparación con los datos de la bibliografía. En la Tabla 4.4 se muestran las antocianinas presentes en la fresa que han sido descritas por otros autores y recogidas en bases de datos. En dicha Tabla 4.4 se han subrayado los antocianos que hemos identificado en nuestra muestra de fresa.

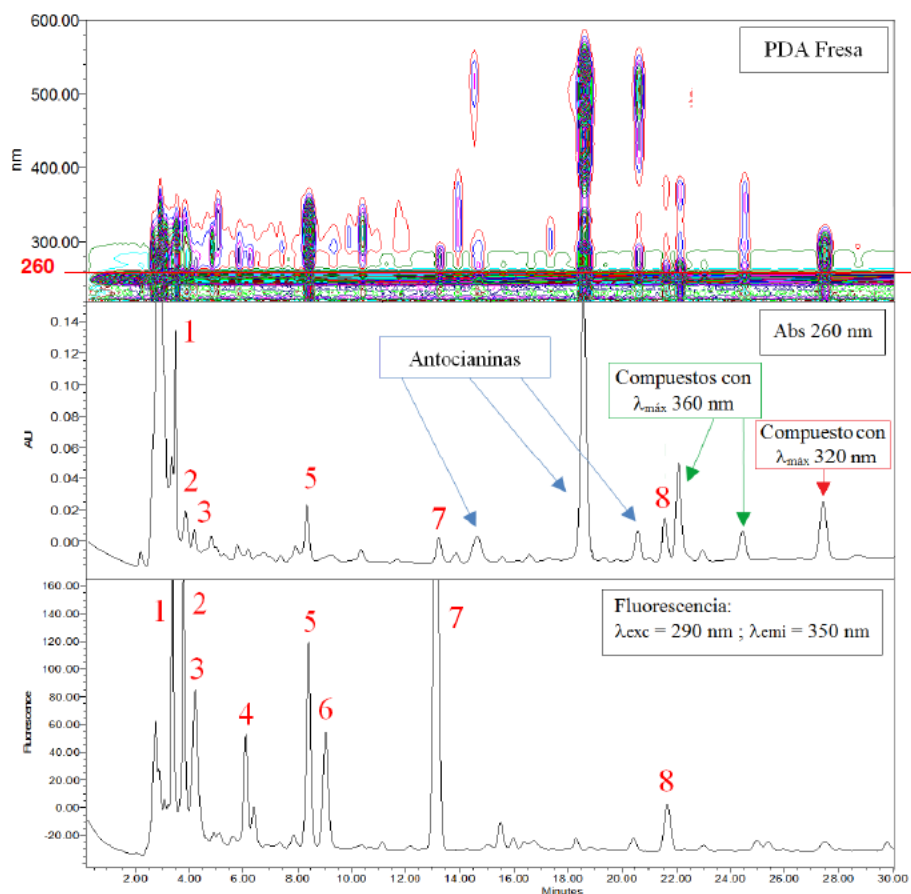
**Tabla 4.4:** Antocianos presentes en la fresa según la bibliografía.

Antocianinas	Phenol-Explorer (mg/100g)	Aaby <i>et al.</i> , 2012	Lopes da Silva <i>et al.</i> 2007 (%)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 (μmol/100g)	Sadilova <i>et al.</i> , 2009	Zheng <i>et al.</i> 2007 (μg/g)	Stintzing <i>et al.</i> 2006 (%)	Stoj <i>et al.</i> , 2006 (mg/L)	Fugel <i>et al.</i> , 2005	García-Viguera <i>et al.</i> , 1999 (%)	Goiffon <i>et al.</i> , 1999
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	2,88	X	3-10	8,9	X	16,2	7,5	68	X	3,1	X
<u>Pelargonidin 3-O-glucósido</u>	47,14	X	77 a 90	1,7 a 4,1	X	112,2	82,1	1681	X	89,3	X
<u>Pelargonidin 3-O-rutinósido</u>	1,32	X	6-11	--	--	--	4,9	--	--	7,6	--
Pelargonidin 3-O-arabinósido	0,42	--	--	--	--	--	--	--	X	--	X
Cianidin 3-O-malonil-glucósido	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pelargonidin 3-O-malonil-glucósido	4,78	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pelargonidin	4,31	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Cianidin	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Cianidin 3-O-(6``-succinil-glucosa)	1,22	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pelargonidin 3-O-(6``-succinil-glucosa)	10,44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Otros no identificados	--	--	--	--	--	--	5,5	--	--	--	--

Podemos observar como todos los autores que han estudiado los antocianos de la fresa indican la presencia de cianidin 3-O-glucósido y pelargonidin 3-O-glucósido. La mayoría de autores establece que la fresa se componen de dos o tres antocianos principalmente, la excepción la encontramos en la base de datos de Phenol-Explorer donde se indica la presencia de 9 antocianos en la fresa, aunque cabe destacar la pequeña cantidad de alguno de ellos como por ejemplo el cianidin con 0,5 mg/100 g o pelargonidin 3-O-arabinósido con 0,42 mg/100 g. Nuestros resultados son concordantes con los descritos por la mayoría de los autores.

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la fresa**

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos obtenidos a una absorbancia de 260 nm y a unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm, se muestran en la Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la fresa.

Los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se corresponden con los picos numerados del 1 al 8 cuya identificación queda recogida en la Tabla 4.5. En el cromatograma detectado por absorbancia a 260 nm además de estos compuestos se detectan las tres antocianinas ya descritas en la fresa y otros compuestos con máximos de longitud de onda a 320 y 360 nm.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 3, 5, 7 y 8) y flavan-3-oles monoméricos

(picos nº 2, 4 y 6) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

En la Tabla 4.5 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.8. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.5:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la fresa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	0,14	250	271	Ácido gálico
2	3,7	0,02	180	280	(-)-Epigallocatequina
3	4,4	0,015	90	259 y 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
4	6,1	--	50	280	(+)-Catequina
5	8,3	0,02	120	255	Ácido 4-hidroxibenzoico
6	9,0	--	60	280	(-)-Epicatequina
7	13,3	--	300	238 y 274	Ácido siríntrico
8	21,5	--	30	258 y 365	Ácido elátrico

Como se puede observar por los datos recogidos en la Tabla 4.6, los análisis de los distintos autores no son muy coincidentes entre sí probablemente por no disponer de un buen método de análisis. Tan solo Russell *et al.*, 2009 y las dos bases de datos consultadas dan un mayor número de estos compuestos identificados en la fresa. En nuestro caso además se detecta ácido siríntrico que no ha sido anteriormente descrito. Además, gracias al espectro de fluorescencia, hemos sido capaces de identificar también la presencia de diversos flavan-3-oles monoméricos como (-)-epigallocatequina, (+)-catequina y (-)-epicatequina. Si bien, las bases de datos de polifenoles tales como USDA y Phenol-Explorer logran identificar un mayor número de compuestos de flavan-3-oles monoméricos como son la (+)-gallocatequina, la (-)-epicatequina 3-O-galato y la (-)-epigallocatequina 3-O-galato pero su presencia es en pequeñas cantidades.



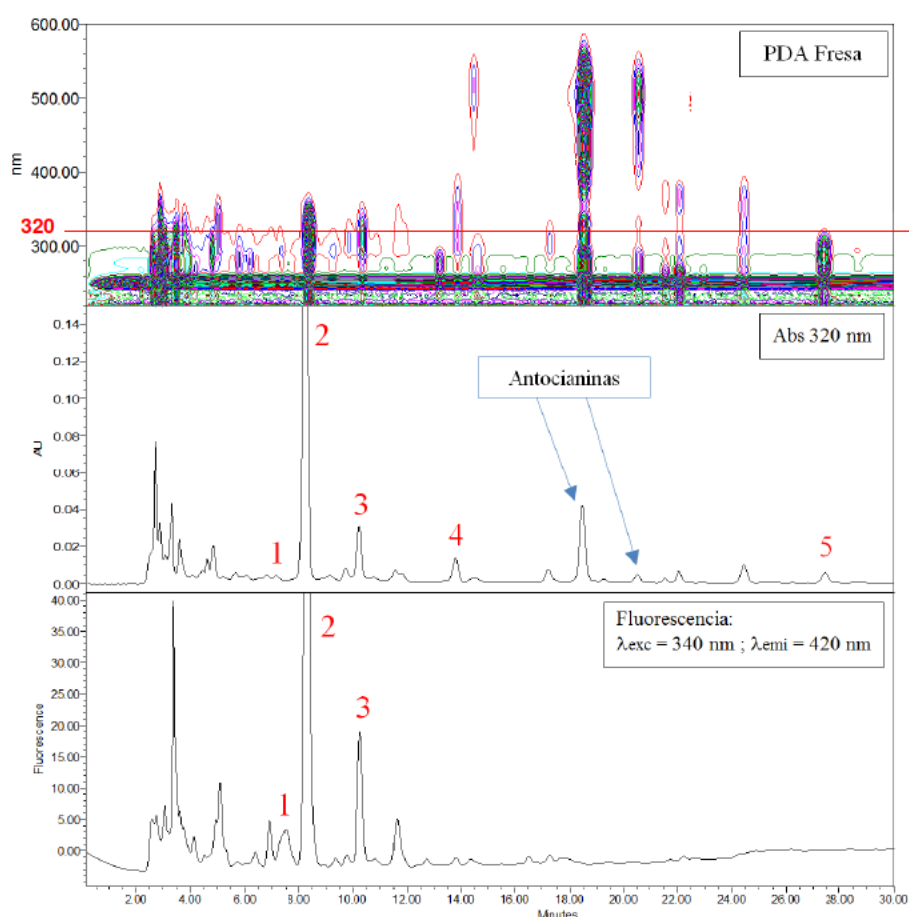
Respecto a la presencia de estilbenos, autores como Huang & Mazza 2011 y Viñas *et al.*, 2008 indican la presencia de resveratrol y piceido en la fresa, nosotros no hemos podido identificar ninguno de ellos.

**Tabla 4.6:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la fresa según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA database (mg/100g)	Huang & Mazza 2011 (ng/g)	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Viñas <i>et al.</i> , 2008 (µg/mL)	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 (µmol/100g)	Sadilova <i>et al.</i> , 2007	Zheng <i>et al.</i> 2007 (µg/g)	Tsanova-Sanova <i>et al.</i> , 2005 (%)	Breitfellner <i>et al.</i> , 2003 (mg/kg)	Arts <i>et al.</i> , 2000	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS													
Ácido gálico	--	--	--	1,67	--	--	--	--	--	--	6,10	X	--
Ácido 3,4- dihidroxibenzoico	--	--	--	39,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido 4- hidroxibenzoico	--	--	--	194	--	--	--	X	--	--	1,43	--	4,0
Ácido 4- hidroxibenzoico 4- O-glucósido	1,53	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido vanílico	--	--	--	98,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido elágico	1,24	--	--	--	--	--	--	--	6,1	--	--	--	50,9
Ácido elágico- glucosa	2,85	--	--	--	--	41,4	--	--	20,3	--	--	--	--
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS													
(+)-Gallocatequina	0,05	0,03	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(+)-Catequina	6,36	3,32	--	--	--	--	8,6	--	--	31,1	--	X	--
(-)-Epicatequina 3-O-galato	0,28	0,15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(-)- Epigallocatequina	0,06	0,78	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(-)-Epicatequina 3-O-galato	--	0,11	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(-)-Epicatequina	7,5* 10 <sup>-3</sup>	0,12	--	--	--	--	--	--	--	1,8	--	--	--
ESTILBENOS													
Resveratrol	0,35	--	2,4	--	0,11	--	--	--	--	--	--	--	--
Piceido	--	--	160	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la fresa

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm tal y como se muestra en la Figura 4.9.



**Figura 4.9:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de ácidos hidroxicinámicos presentes en la fresa.

Los ácidos hidroxicinámicos se corresponden con los picos numerados del 1 al 5 y su identificación se recoge en la Tabla 4.7. En el cromatograma de absorbancia a 320 nm se detectan dos antocianinas. Para la identificación de los picos se tiene en cuenta la coincidencia del tiempo de retención con los respectivos patrones y el espectro obtenido en ultravioleta visible, además de la comparación con los datos de la bibliografía recogidos en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.7:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la fresa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	7,9	0,01	3,3	325	Ácido clorogénico
2	8,3	0,25	100	314	Ácido p-Cumaroil-glucósido
3	10,3	0,025	20	248 y 323	Ácido cafeico
4	13,8	0,018	--	--	n.i.
5	28,2	0,01	--	279	Ácido cinámico
--	18,5	--	--	310	Ácido p-Cumárico (*)

(n.i.) No identificado      (\*) Tras hidrólisis

Los análisis por cromatografía muestran una eficiente separación de los compuestos. La bibliografía estudiada y reflejada en la Tabla 4.8 identifica en la fresa hasta 7 ácidos hidroxicinámicos entre distintos autores, de estos en el presente estudio se han detectado 5 de los cuales uno está sin identificar.

**Tabla 4.8:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en la fresa según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Zheng <i>et al.</i> 2007 (mg/kg) (*)	Breitfeller <i>et al.</i> , 2002 (mg/kg)	Häkkinen & Törrönen 2000	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
<u>Ácido p-Cumárico glucósido</u>	4,36	16,86	19,3	--	X	34,3
<u>Ácido p-Cumárico</u>	0,21	--	--	15,98	--	--
<u>Ácido cinámico</u>	0,22	--	--	9,74	--	--
Ácido ferúlico 3-O-glucósido	0,10	--	--	--	--	--
<u>Ácido cafeico</u>	--	--	--	2,59	X	--
Ácido cafeico 3-O-glucósido	0,10	--	--	--	--	--
<u>Ácido clorogénico</u>	1,93	--	--	--	--	--

(\*) Análisis realizado tras la hidrólisis

Además, para ayudar a la correcta identificación de los compuestos se realizó la hidrólisis ácida del puré de fresa, que hidroliza los ésteres de los ácidos hidroxycinámicos. Así, en el cromatograma de fluorescencia se comprueba que el pico número 2, ácido *p*-Cumaroil-glucósido (8,3 minutos) desaparece tras la hidrólisis y, el pico número 3 ácido cafeico que no está esterificado (10,3 minutos) se mantiene. Además, con la hidrólisis, aparece un pico a los 18,5 minutos que se ha identificado como ácido *p*-Cumárico.

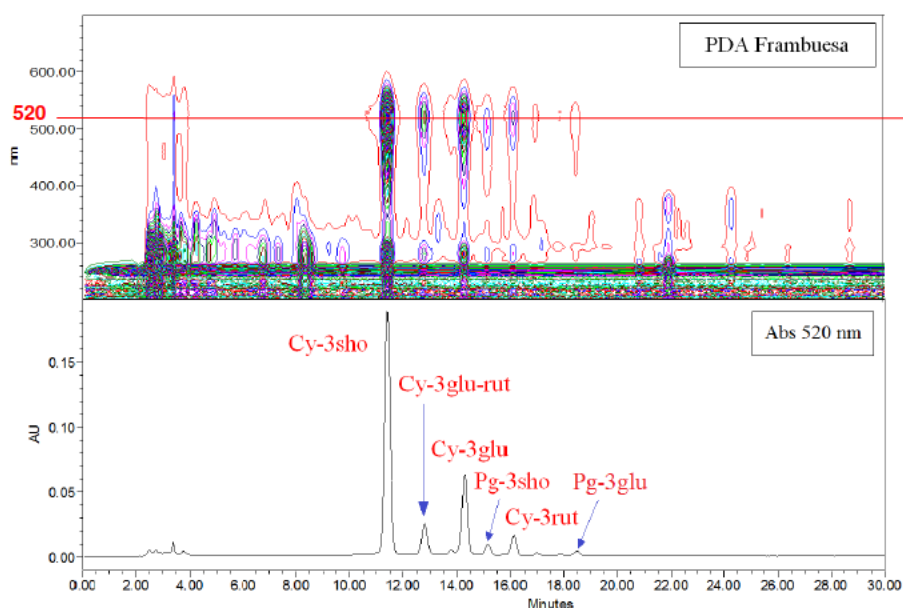
Cabe destacar que la base de datos de Phenol-Explorer establece la presencia de ácido ferúlico 4-O-glucósido y ácido cafeico 3-O-glucósido pero su presencia es, en ambos casos, en cantidades de 0,10 mg/100 g.

#### 4.1.2.2.- FRAMBUESA (Raspberry; *Rubus idaeus* L.)

La muestra de frambuesa analizada ha sido un puré con 7,2 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Antocianos presentes en la frambuesa

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm de la frambuesa se muestra en la Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la frambuesa.

La propuesta de identificación de la Figura 4.10, al no disponer de patrones de identificación de antocianos, ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.9.

En total se lograron identificar 6 antocianos presentes en la frambuesa coincidiendo con la mayoría de los autores, aunque Lee *et al.*, 2012 y la base de datos del Phenol-Explorer identifican un mayor número de antocianos.

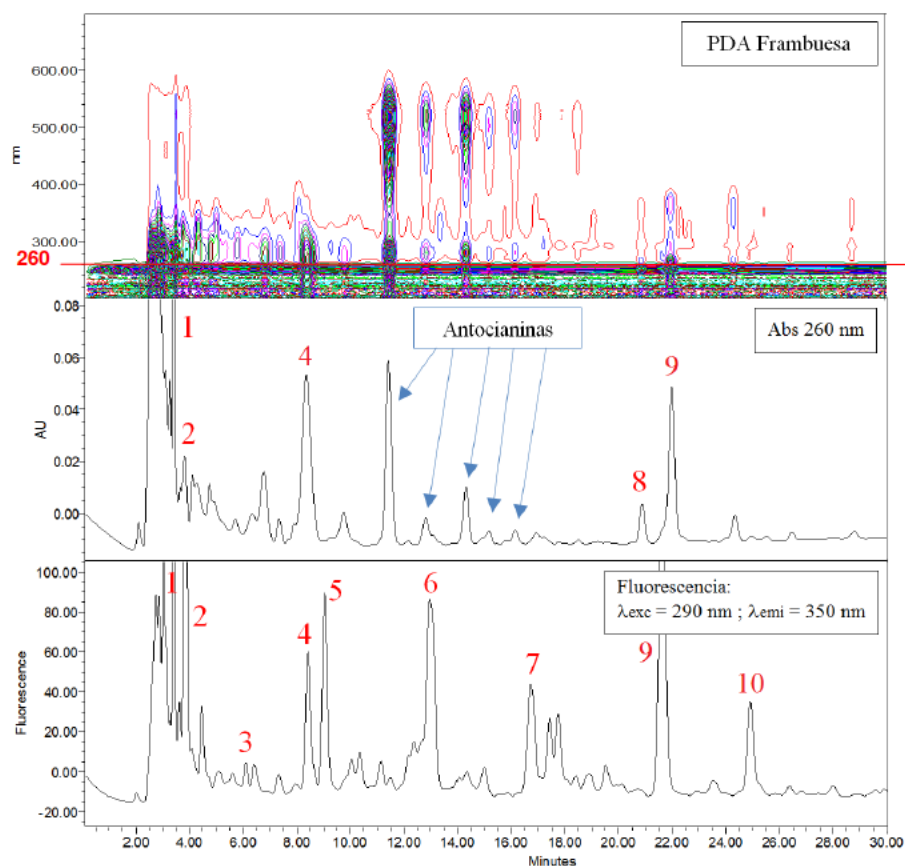
**Tabla 4.9:** Antocianos presentes en la frambuesa según la bibliografía.

Antocianinas	Phenol-Explorer (mg/100g)	Lee <i>et al.</i> 2012	Bowen-Forbes <i>et al.</i> 2010 (mg/100g)	Wang <i>et al.</i> , 2009 (Cy-glu equ/g peso fresco)	Stoj <i>et al.</i> , 2006 (mg/L)	Mullen <i>et al.</i> 2002	Goiffon <i>et al.</i> 1999 (%)
<u>Cianidin 3-O-sophorósido</u>	36,91	X	--	58,7	--	Mayor	78,2
<u>Cianidin 3-(2G-glucosil- rutinósido)</u>	9,12	X	163	326,2	--	X	Menor
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	13,32	X	151	--	429	X	15,9
<u>Pelargonidin 3-O-sophorósido</u>	2,99	X	--	--	--	X	Menor
<u>Cianidin 3-O-rutinósido</u>	4,95	X	--	82,5	682	X	Menor
<u>Pelargonidin 3-O-glucósido</u>	1,65	X	--	--	--	X	--
Pelargonidin 3-(2G-glucosil- rutinósido)	0,74	X	--	--	--	X	--
Pelargonidin 3-O-rutinósido	0,42	X	--	--	--	X	--
Cianidin 3-O-glucosil-malonato	--	--	X	--	--	--	--
Cianidin 3,5-O-diglucósido	--	X	--	--	--	--	--
Cianidin 3-O-glucósido	--	X	--	--	--	--	--
Cianidin	0,53	--	--	--	--	--	--
Delphinidin 3-O-glucósido	0,21	--	--	--	--	--	--
Malvidin 3-O-glucósido	0,62	--	--	--	--	--	--

Podemos observar como la mayoría de autores que han estudiado los antocianos de la frambuesa indican la presencia de cianidin 3-O-sophorósido como uno de los antocianos mayoritarios aunque Stoj 2006 indica que el mayoritario es cianidin 3-O-rutinósido y Wang 2009 establece que es cianidin 3-(2G-glucosil-rutinósido). La mayoría de autores establece que la frambuesa se compone de cinco antocianos principalmente, la excepción la encontramos en la base de datos de Phenol-Explorer y en la investigación de Lee *et al.* 2012 donde se indican la presencia de 11 y 10 antocianos presentes en la frambuesa respectivamente, aunque cabe destacar la pequeña cantidad de alguno de ellos como por ejemplo el delphinidina 3-O-glucósido con 0,21 mg/100 g o pelargonidin 3-O-rutinósido con 0,41 mg/100 g. Nuestros resultados son concordantes con los descritos por la mayoría de los autores.

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la frambuesa**

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emi} = 350 \text{ nm}$  como se muestran en la Figura 4.11.



**Figura 4.11:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la frambuesa.

La Tabla 4.10 muestra la identificación de los picos de absorbancia y fluorescencia obtenidos de la frambuesa. Para su identificación, se tiene en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible, así como los datos de análisis obtenidos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.11.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de algunos ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10) y flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 5) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además,

el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal. Sin embargo, el ácido elágico-arabinósido (pico nº 8) no se detecta y los ácidos gálico y 4-hidroxibenzoico (picos 1 y 4) se detectan mejor en el cromatograma de absorbancia a 260 nm aunque este cromatograma también muestra los antocianos de la frambuesa.

**Tabla 4.10:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la frambuesa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,3	0,1	250	271	Ácido gálico
2	4,7	0,02	600	--	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico
3	6,1	--	10	--	(+)-Catequina
4	8,3	0,05	60	255	Ácido 4-hidroxibenzoico
5	9,0	--	90	280	(-)-Epicatequina
6	13,4	--	90	238 y 274	Ácido siríntrico
7	16,7	--	40	--	n.i.
8	21,5	0,05	150	258 - 365	Ácido elágico-arabinósido
9	25,0	0,01	30	--	Ácido elágico
10	24,8	--	40	--	n.i.

(n.i.) No identificado

De acuerdo con nuestros resultados no se detectó la presencia de ácido vanílico tal y como indica Russell *et al.* 2009.

Diversos autores como Mullen *et al.* 2002 y la base de datos Phenol-Explorer indican la importante presencia de Lambertianin C y Sanguin H-6 en la frambuesa con valores tienen 35,68 y 81,34 mg/100 g respectivamente, pero estos compuestos no han sido identificados en este estudio.

Respecto a la presencia de estilbenos, Huang & Mazza 2012 indica la presencia de piceido con 211,5 ng/g y de resveratrol con 58,6 ng/g, pero aquí no se ha identificado ninguno de ellos aunque puede que el pico número 10 (24,8 minutos) corresponda con piceido.



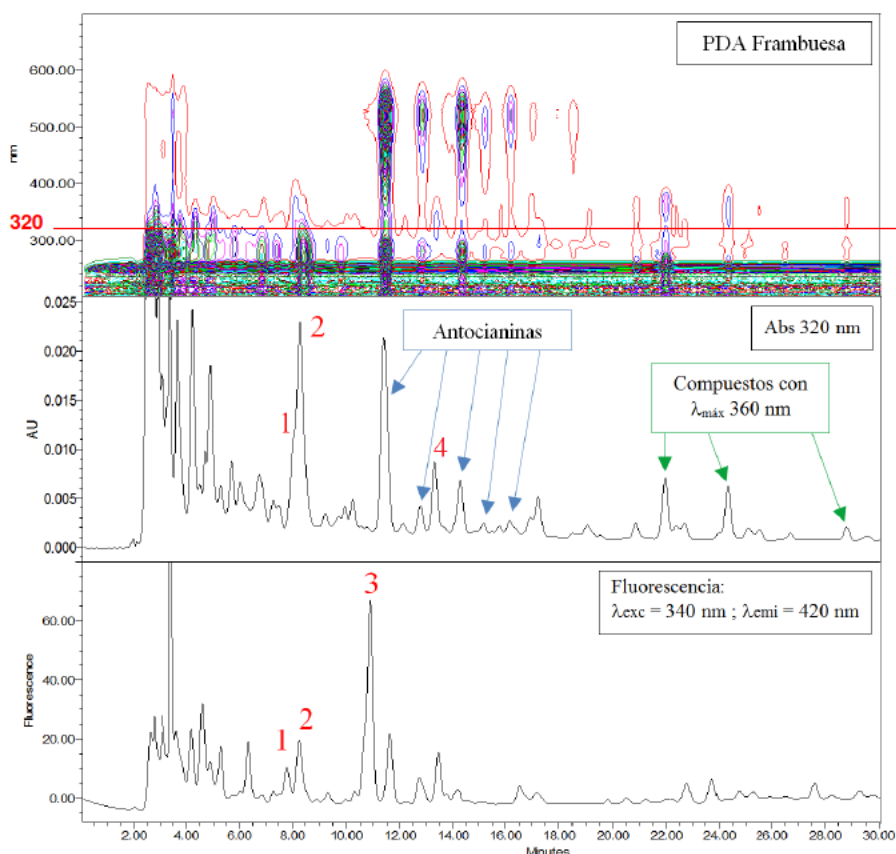
**Tabla 4.11:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la frambuesa según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA database (mg/100g)	Bobinaite <i>et al.</i> , 2012 (mg/100g)	Lee <i>et al.</i> 2012	Huang & Mazza 2011 (ng/g)	Gasperotti <i>et al.</i> 2010	Remberg <i>et al.</i> 2010	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 (μmol/100g)	Tsanova-Sanova <i>et al.</i> , 2005 (%)	Mullen <i>et al.</i> 2002 (*)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS													
Ácido gálico	--	--	--	--	--	--	--	5,7	--	--	--	--	--
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	--	--	--	--	--	--	--	3,8	--	--	--	--	--
Ácido 4- hidroxibenzoico	--	--	--	--	--	--	--	33	4,9	--	--	--	2,9
Ácido vanílico	--	--	--	--	--	--	--	24	--	--	--	--	--
Ácido siríngeo	--	--	--	--	--	--	--	107	--	--	--	--	--
Ácido elágico	1,5	--	120	X	--	X	X	--	31	--	--	X	88
Ácido elágico arabinósido	2,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido elágico acetil-xilosido	0,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido elágico acetil-arabinósido	0,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS													
(-)- Epigallocatequina	--	0,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(-)-Epicatequina 3-O-galato	--	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(+)-Catequina	0,5	1,5	--	--	--	--	--	--	--	--	13	--	--
(-)-Epicatequina	5,0	4,1	--	--	--	--	--	--	--	8,5	36	--	--
ESTILBENOS													
Resveratrol	--	--	--	--	58	--	--	--	--	--	--	--	--
Piceido	--	--	--	--	211	--	--	--	--	--	--	--	--

(\*) Tras hidrólisis

### ➤ Ácidos hidroxycinámicos presentes en la frambuesa

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxycinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm y están representados en la Figura 4.12.



**Figura 4.12:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxycinámicos presentes en la frambuesa.

Si nos fijamos en el cromatograma de absorbancia obtenido a 320 nm podemos observar como solo se identifican tres ácidos hidroxycinámicos apareciendo los picos nº 1 y 2 correspondientes a los ácidos clorogénico y *p*-Cumaroil-glucósido respectivamente, bastante solapados entre sí. Además, en este perfil de absorbancia se pueden identificar cinco antocianinas y tres compuestos cuyo máximo de absorbancia está a 360 nm.

Respecto al perfil obtenido con el detector de fluorescencia, cabe destacar la identificación del pico nº 3 el cual no se detecta en el perfil de absorbancia a 320 nm.

En la Tabla 4.12 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.12. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.12:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la frambuesa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	7,8	--	10	325	Ácido clorogénico
2	8,2	0,025	20	314	Ácido <i>p</i> -Cumaroil-glucósido
3	10,5	--	60	248 y 323	Ácido cafeico
4	13,3	0,008	--	--	n.i.

(n.i.) No identificado

Los tres ácidos hidroxicinámicos detectados ya han sido previamente descritos en la frambuesa por otros autores, sin embargo, aquí no se ha detectado la presencia de ácido ferúlico ni ácido *p*-Cumárico tal y como indican Jacobek *et al.* 2007, Mullen *et al.* 2002 y Hakkinen *et al.* 1999.

**Tabla 4.13:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en la frambuesa según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Remberg <i>et al.</i> 2010	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Mullen <i>et al.</i> 2002 (*)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
<u>Ácido cafeico</u>	--	X	3,23	--	1,5
Ácido <i>p</i> -Cumárico	$6,4 \cdot 10^{-4}$	X	4,24	X	2,5
Ácido ferúlico	--	X	4,29	X	2,5
<u>Ácido clorogénico</u>	0,57	--	--	--	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumaroil 4-glucosa</u>	0,32	--	--	--	--

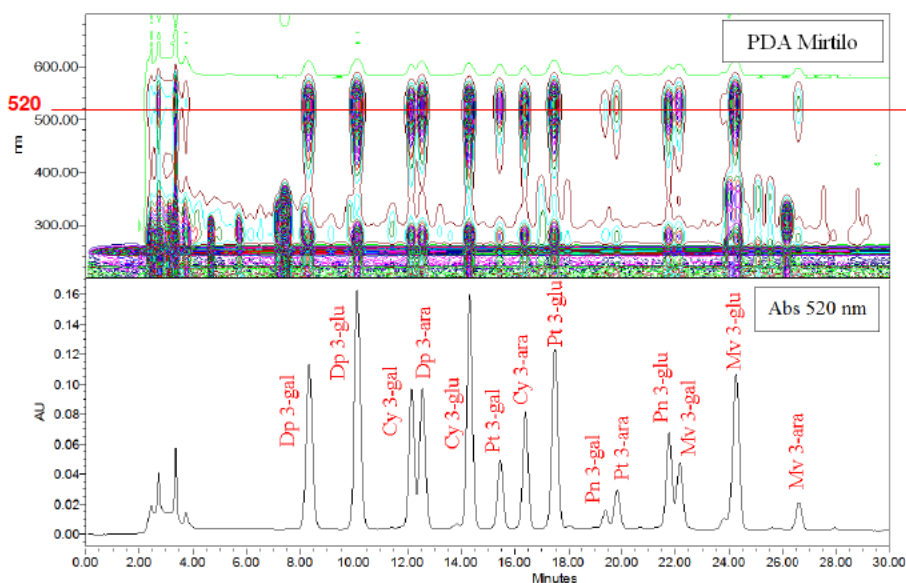
(\*) Tras hidrólisis

#### 4.1.2.3.- MIRTILO (Blueberry; *Vaccinium myrtillus* L. wild)

Para el estudio del mirtilo se ha analizado un zumo de 12,9 °Brix procedente de la casa comercial Grünewald (Austria).

##### ➤ Antocianos presentes en el mirtilo

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm del mirtilo se muestra en la Figura 4.13.



**Figura 4.13:** Cromatograma general y perfil de los antocianos presentes en el mirtilo.

De todas las frutas estudiadas en el presente trabajo, el mirtilo es el que tiene un mayor número de antocianos. La propuesta de identificación de la Figura 4.13 ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía de diversos autores tal y como se muestra en la Tabla 4.14. Se han identificado 14 antocianos en el mirtilo.

Podemos observar como todos los autores que han estudiado los antocianos del mirtilo indican un elevado número de antocianos como, por ejemplo, la base de datos Phenol-Explorer que establece la presencia de 25 antocianos en total o el resto de autores estudiados que establecen que son 15 los antocianos presentes en el mirtilo. Si bien, cabe destacar que algunos de los antocianos que la base de datos de Phenol-Explorer identifica se encuentran en baja concentración como por ejemplo peonidin 3-O-(6''-acetil-galactósido) con un valor de 0,03 mg/100 g o petunidin 3-O-(6''-acetil-galactósido) con 0,06 mg/100 g.

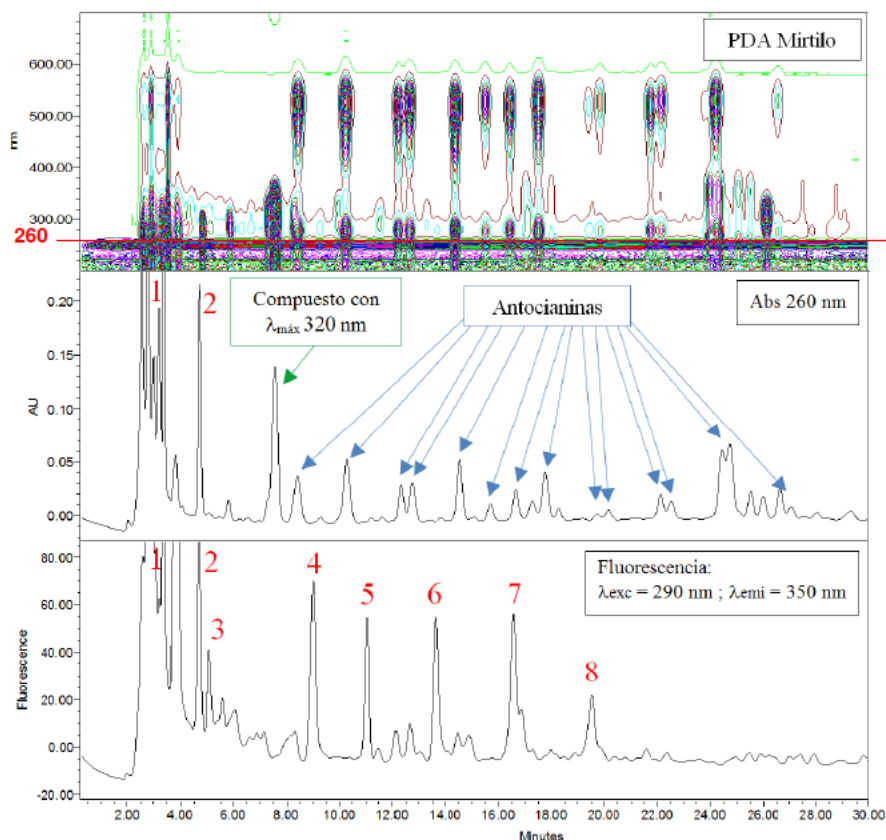
Nuestros resultados coinciden con los descritos por la mayoría de los autores que logran la identificación de 14 o 15 antocianos presentes en el mirtilo, los mismos que aquí se han detectado.

**Tabla 4.14:** Antocianos presentes en el mirtilo según la bibliografía.

Antocianinas	Phenol-Explorer (mg/100g)	Rodríguez -Medina <i>et al.</i> 2009	Tian <i>et al.</i> 2005	Wu & Prior 2005	Goiffon <i>et al.</i> 1999	Versari <i>et al.</i> 1997
Delphinidin	--	X	--	--	--	--
<u>Delphinidin 3-O-arabinósido</u>	13,98	--	X	X	X	X
<u>Dephinidin 3-O-galactósido</u>	20,50	X	X	X	X	X
<u>Delphinidin 3-O-glucósido</u>	8,08	X	X	X	X	X
Delphinidin 3-O-(6''-acetil-galactósido)	0,72	--	--	--	--	--
Delphinidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	2,39	--	--	--	--	--
<u>Cianidin 3-O-arabinósido</u>	2,16	X	X	X	X	X
<u>Cianidin 3-O-galactósido</u>	5,41	X	X	X	X	X
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	1,37	X	X	X	X	X
Cianidin 3-O-(6''-acetil-galactósido)	0,10	--	--	--	--	--
Cianidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	0,95	--	--	--	--	--
<u>Petunidin 3-O-arabinósido</u>	8,53	--	X	X	X	X
<u>Petunidin 3-O-galactósido</u>	12,73	X	X	X	X	X
<u>Petunidin 3-O-glucósido</u>	6,09	X	X	X	X	X
Petunidin 3-O-(6''-acetil-galactósido)	0,06	--	--	--	--	--
Petunidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	1,35	--	--	--	--	--
Peonidin 3-O-arabinósido	0,29	--	X	--	X	X
<u>Peonidin 3-O-galactósido</u>	0,90	X	X	X	X	X
<u>Peonidin 3-O-glucósido</u>	0,20	X	X	X	X	X
Peonidin 3-O-(6''-acetil-galactósido)	0,03	--	--	--	--	--
Peonidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	0,39	--	--	--	--	--
<u>Malvidin 3-O-arabinósido</u>	13,42	--	X	X	X	X
<u>Malvidin 3-O-galactósido</u>	17,23	X	X	X	X	X
<u>Malvidin 3-O-glucósido</u>	11,18	X	X	X	X	X
Malvidin 3-O-(6''-acetil-galactósido)	2,64	--	--	--	--	--
Malvidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	3,29	--	--	--	--	--

### ➤ Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del mirtilo

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emi} = 350 \text{ nm}$  (Figura 4.14).



**Figura 4.14:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el mirtilo.

Para la identificación de los picos de los perfiles se tiene en cuenta el tiempo de retención, el espectro en ultravioleta visible y los datos de la bibliografía recogidos en la Tabla 4.16.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 2, 5, 6 y 7), flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 4) y de estilbenos (pico nº 8) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal debido a que el perfil de absorbancia a 260 nm muestra un elevado número de picos correspondientes a los 14 antocianos presentes y a compuestos con máximos de absorbancia a 320 nm.

La Tabla 4.15 muestra la identificación de los picos de la Figura 4.14. La mayoría de los compuestos identificados por fluorescencia coinciden con los previamente descritos por otros autores (Tabla 4.16).

**Tabla 4.15:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el mirtilo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,2	0,20	250	271	Ácido gálico
2	4,8	0,20	110	259 y 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	5,3	--	40	--	(+)-Catequina
4	9,0	--	60	--	(-)-Epicatequina
5	11,5	--	60	260 y 292	Ácido vanílico
6	13,3	--	60	238 y 274	Ácido sirínico
7	16,7	--	60	--	n.i.
8	19,5	--	20	--	Resveratrol 3-O-glucósido

(n.i.) No identificado

La base de datos Phenol-Explorer establece la presencia del ácido 4-hidroxibenzoico 4-O-glucósido con un valor de 0,55 mg/100g, que en el presente estudio no se ha detectado. En cambio se identifican los ácidos vanílico y sirínico, y el estilbeno resveratrol 3-O-glucósido, compuestos no descritos anteriormente en este fruto.

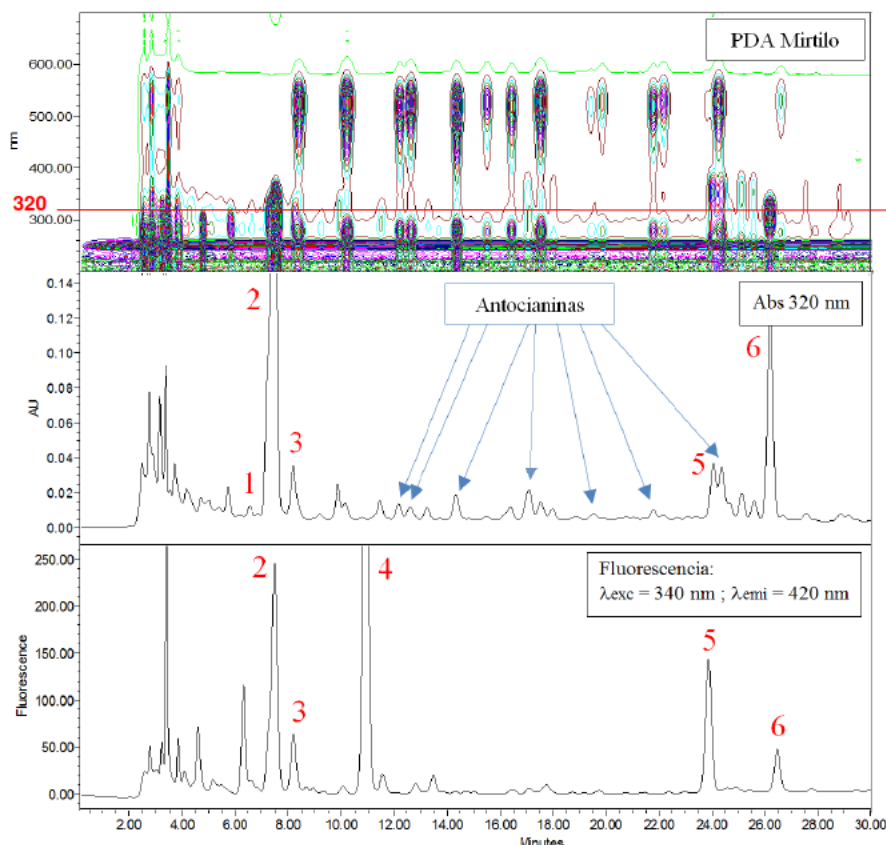
**Tabla 4.16:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del mirtilo según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA database (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2012 (mg/100g)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> , 2009	Nacz & Shahidi 2006	Tsanova-Savova <i>et al.</i> , 2005 (%)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS							
Ácido gálico	--	--	0,48	X	X	--	--
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	--	--	--	X		--	--
Ácido vanílico 4-O-glucósido	--	--	--	X		--	--
Ácido 4-hidroxibenzoico 4-O-glucósido	0,55	--	--	--	--	--	--
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico 4-O-glucósido	0,40	--	--	--	--	--	--
Ácido gálico 4-O-glucósido	0,50	--	--	--	--	--	--
Ácido elágico	--	--	--	X	X	--	0,9
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS							
(+)-Catequina	--	37,3	--	--	X	16,6	--
(-)-Epicatequina	1,11	13,7	--	--	--	32,9	--
(-)-Epigallocatequina	--	0,66	--	--	--	--	--
(+)-Gallocatequina	--	0,12	--	--	--	--	--



### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en el mirtilo

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm como se muestra en la Figura 4.15.



**Figura 4.15:** Perfiles de ácidos hidroxicinámicos del mirtilo.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos (picos nº 2, 3, 4, 5 y 6) que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm donde se vuelven a detectar los antocianos.

En la Tabla 4.17 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.15. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.18.

**Tabla 4.17:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos del mirtilo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	6,5	0,02	120	--	Ácido cafeico 4-O-glucósido
2	7,6	0,5	250	248 - 325	Ácido clorogénico
3	8,2	0,04	70	314	Ácido <i>p</i> -Cumárico 3-O-glucósido
4	10,5	--	500	248.- 323	Ácido cafeico
5	24	0,04	150	248 - 323	Ácido ferúlico
6	26,5	0,12	60	247 - 324	Ácido sinápico

(n.i.) No identificado

En trabajos de otros autores (Tabla 4.18) se ha descrito la presencia de cinco de los seis ácidos hidroxicinámicos identificados en el mirtilo. La base de datos Phenol-Explorer describe además tres ácidos que no han sido detectados en este estudio. La presencia de ácido sinápico (pico nº 6 de la Figura 4.15 y Tabla 4.17) es la primera vez que se describe en esta fruta.

**Tabla 4.18:** Ácidos hidroxicinámicos del mirtilo según la bibliografía.

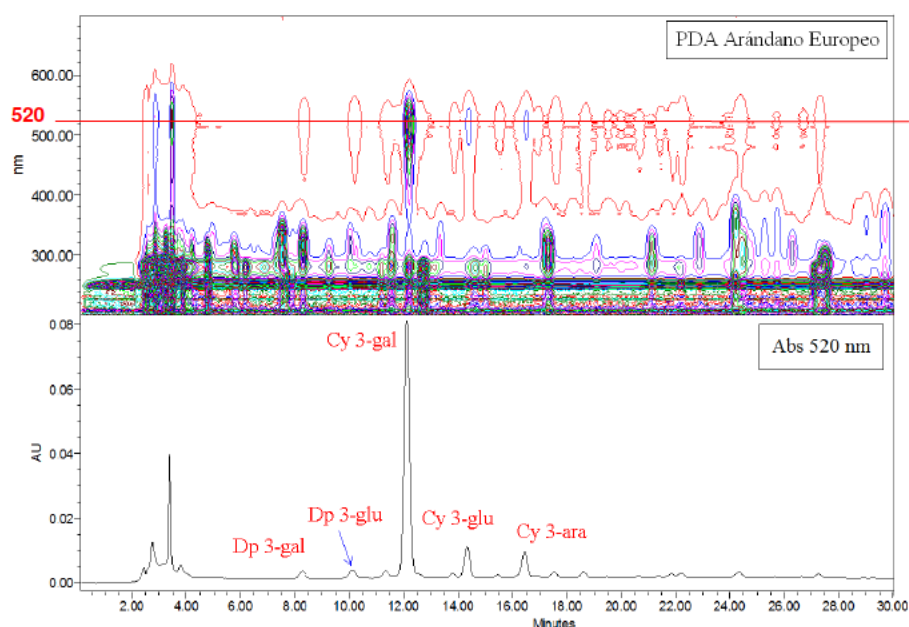
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2012 (mg/100g)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> 2009	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 ( $\mu$ mol/100g)	Nacz & Shahidi 2006	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
Ácido cafeico	--	2,16	--	88,8	X	27,29	1,5
Ácido <i>p</i> -Cumárico	--	--	--	--	X	--	0,5
Ácido <i>p</i> -Cumárico 3-O-glucósido	0,95	--	X	--	--	--	--
Ácido ferúlico	--	--	--	--	X	--	66,5
Ácido clorogénico	131,2	--	X	57,4-270,6	--	--	--
Ácido 3-cafeoil-quínico	0,60	--	--	--	--	--	--
Ácido 4-cafeoil-quínico	0,35	--	--	--	--	--	--
Ácido 5-feruloil-quínico	0,75	--	--	--	--	--	--
Ácido cinámico	--	--	--	1,7	--	--	--
Ácido cafeico 4-O-glucósido	0,30	--	--	--	--	--	--
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	0,55	--	--	--	--	--	--

#### 4.1.2.4.- ARÁNDANO EUROPEO (Cranberry; *Vaccinium oxycoccus L.*)

El arándano europeo analizado procedente de la casa comercial Grünwald (Austria), ha sido un zumo de 12,4 °Brix

##### ➤ Antocianos presentes en el arándano europeo

La Figura 4.16 muestra el cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm del arándano europeo.



**Figura 4.16:** Cromatograma general y perfil de antocianos a 520 nm del arándano europeo.

La propuesta de identificación de la Figura 4.16 ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía, recogidos en la Tabla 4.10 ya que no se dispone de los patrones correspondientes.

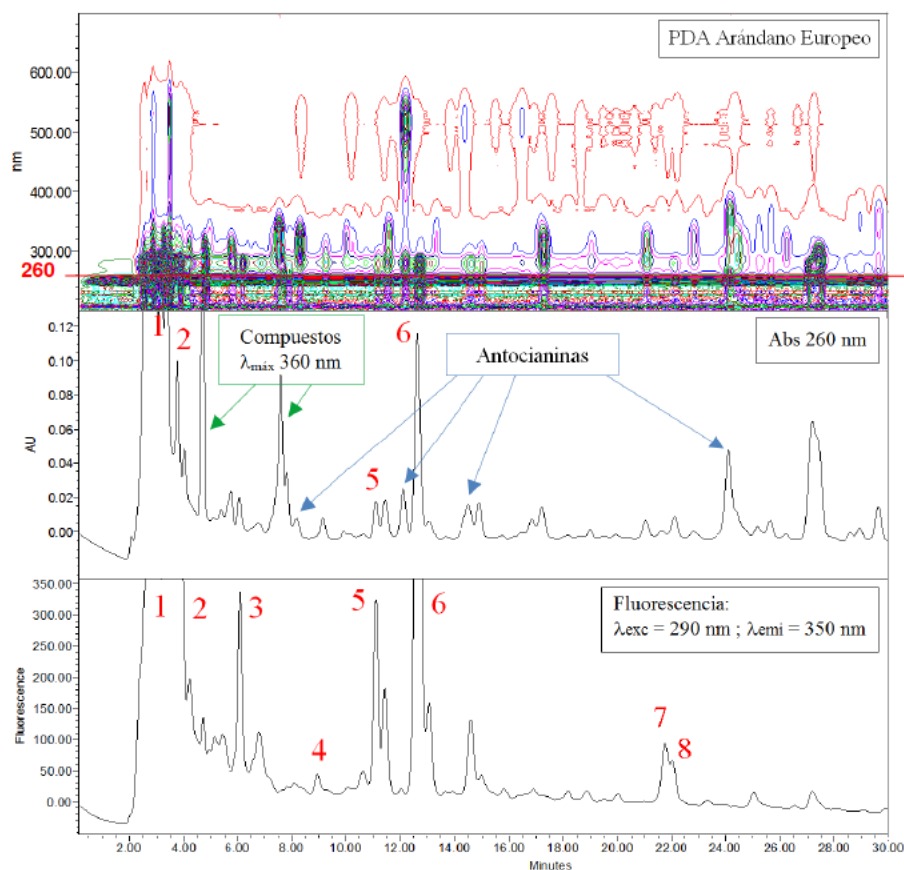
Podemos observar como la identificación realizada por otros autores coincide con la obtenida en el presente trabajo aunque Andersen (1989) y Nacz & Shahidi (2006) describen otros antocianos presentes en el arándano europeo como son: peonidin 3-O-galactósido, peonidin 3-O-glucósido y malvidin 3-O-glucósido, que aquí no se han detectado.

**Tabla 4.19:** Antocianos presentes en el arándano europeo según la bibliografía.

Antocianinas	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> , 2009	Nacz & Shahidi 2006	Andersen 1989 (%)
<u>Delphinidin 3-O-glucósido</u>	X	--	Menor
<u>Delphinidin 3-O-galactósido</u>	--	--	Menor
<u>Cianidin 3-O-galactósido</u>	X	--	Menor
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	X	X	38,3
Peonidin 3-O-galactósido	--	--	Menor
<u>Cianidin 3-O-arabinósido</u>	X	--	Menor
Peonidin 3-O-glucósido	--	X	41,9
Malvidin 3-O-glucósido	--	--	Menor

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del arándano europeo.**

La Figura 4.17 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción a 260 nm y del espectro obtenido por fluorescencia con unas condiciones de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del arándano europeo.



**Figura 4.17:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el arándano europeo.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 2, 5, 6 y 7), flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 4) y estilbenos (pico nº 8) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

El perfil obtenido por absorbancia a 260 nm no es tan específico como el de fluorescencia ya que muestra también los antocianos y picos de compuestos con máximos a 360 nm.

En la Tabla 4.20 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.17. Para esta identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparandolo con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.21.

**Tabla 4.20:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el arándano europeo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	0,6	1200	271	Ácido gálico
2	3,8	0,1	1400	259 - 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	6,2	--	400	280	(+)-Catequina
4	8,9	--	20	280	(-)-Epicatequina
5	11,2	0,02	320	260 - 292	Ácido vanílico
6	12,8	0,11	1100	238 - 274	Ácido sirínico
7	21,8	0,005	90	253 - 365	Ácido elágico
8	22,1	--	80	312	Resveratrol

Los resultados obtenidos coinciden básicamente con los descritos por Wang & Zou 2011, con la diferencia de que ellos detectan el ácido benzoico y en el presente trabajo se detecta el ácido elágico. La base de datos Phenol-Explorer no describe ningún ácido hidroxibenzoico, cuando aquí se han detectado tres, describe solo uno de los

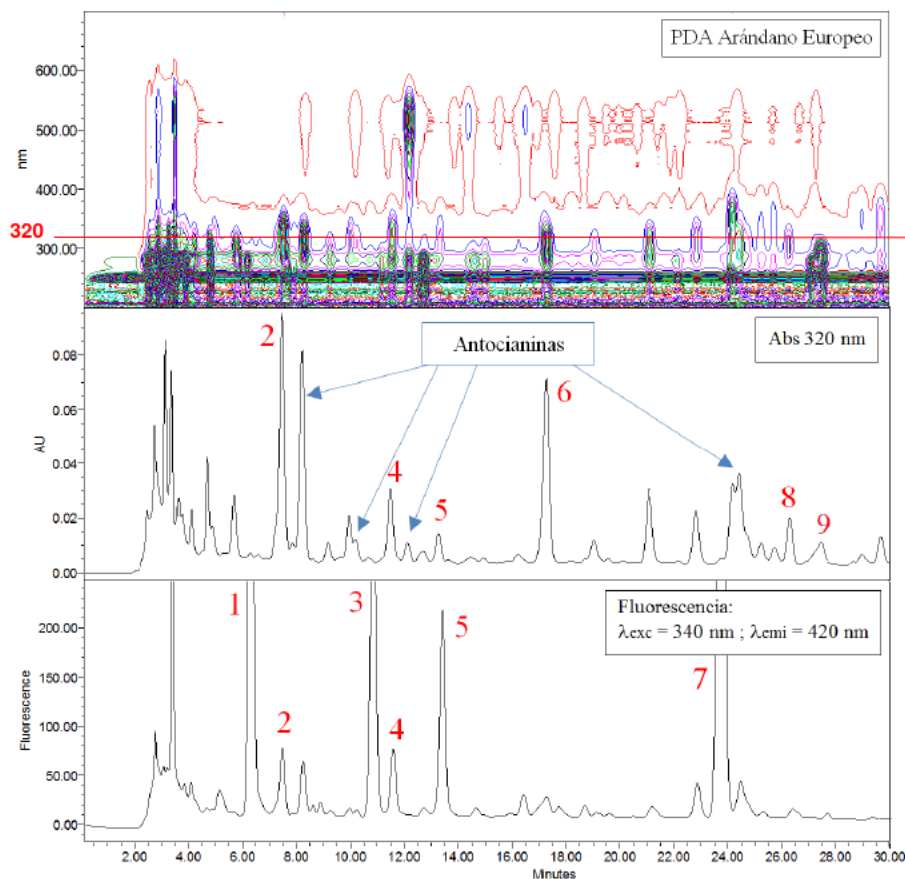
flavan-3-oles observados y sí coincide con la presencia de resveratrol que aquí también se detecta. Respecto al ácido elágico, su presencia en el arándano europeo ha sido descrita por Häkkinen *et al*, 1999.

**Tabla 4.21:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el arándano europeo según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Wang & Zou 2011 (µg/mL)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS			
<u>Ácido elágico</u>	--	--	1,8
Ácido benzoico	--	234,6	--
<u>Ácido 3.4 dihidroxibenzoico</u>	--	0,37	--
<u>Ácido vanílico</u>	--	0,95	--
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS			
<u>(-)-Epicatequina</u>	4,20	6,12	--
<u>(+)-Catequina</u>	--	2,86	--
ESTILBENOS			
<u>Resveratrol</u>	1,92	0,45	--

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm tal y como se muestra en la Figura 4.18.



**Figura 4.18:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo.

En el cromatograma de absorbancia a 320 nm podemos detectar 6 de los 9 compuestos identificados como ácidos hidroxicinámicos en total (picos nº 2, 4, 5, 6, 8 y 9) aunque también se aprecian picos correspondientes a antocianos. Respecto al perfil obtenido con el detector de fluorescencia, es más específico para la identificación de algunos ácidos hidroxibenzoicos como los ácidos cafeico, cafeico 4-O-glucósido y ferúlico (picos nº 3, 5 y 7) y el compuesto no identificado que eluye a 6,5 minutos (pico nº 1).

En la Tabla 4.22 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.18. Esta identificación se basó en el tiempo de retención comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.23.

**Tabla 4.22:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	6,5	--	900	--	n.i.
2	7,6	0,09	80	248 - 325	Ácido clorogénico
3	10,7	--	400	248 - 323	Ácido cafeico
4	11,6	0,03	80	--	n.i. (*) Ácido ferúlico 4-O-glucósido
5	13,4	--	200	--	Ácido cafeico 4-O-glucósido
6	17,2	0,07	--	310	Ácido <i>p</i> -Cumárico
7	24	--	1050	248 - 323	Ácido ferúlico
8	26,2	0,02	--	247 - 324	Ácido sinápico
9	27,2	0,01	--	279	Ácido cinámico

(n.i.) No identificado (\*) Tras hidrólisis

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden sobretodo con los descritos por Wang & Zou, 2011. Aquí se han detectado tres compuestos más de los cuales dos se han identificado como los ácidos clorogénico y cafeico 4-O-glucósido.

Para la identificación de estos compuestos, la muestra de arándano europeo se sometió a un proceso de hidrólisis y a un nuevo análisis siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3 de materiales y métodos.

Tras la hidrólisis, se observó que el pico número 1 de la Figura 4.14 (6,5 minutos, n.i.) no se hidrolizó, lo que indica que no se trata de un compuesto esterificado. Los picos 3 (10,7 minutos, ácido cafeico) y 5 (13,4 minutos, ácido cafeico 4-O-glucosido) sí que se hidrolizaron pudiendo ser éste último el pico número 4 ácido ferúlico 4-O-glucosilado.

**Tabla 4.23:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano europeo según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Wang & Zou, 2011 ( $\mu$ g/mL)	Naczek & Shahidi 2006	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
<u>Ácido sinápico</u>	--	18,87	X	--
<u>Ácido cinámico</u>	--	0,78	--	--
<u>Ácido ferúlico</u>	--	3,86	--	18,4
<u>Ácido cafeico</u>	--	0,95	X	3,3
<u>Ácido <i>p</i>-Cumárico</u>	2,02	10,88	X	2,1

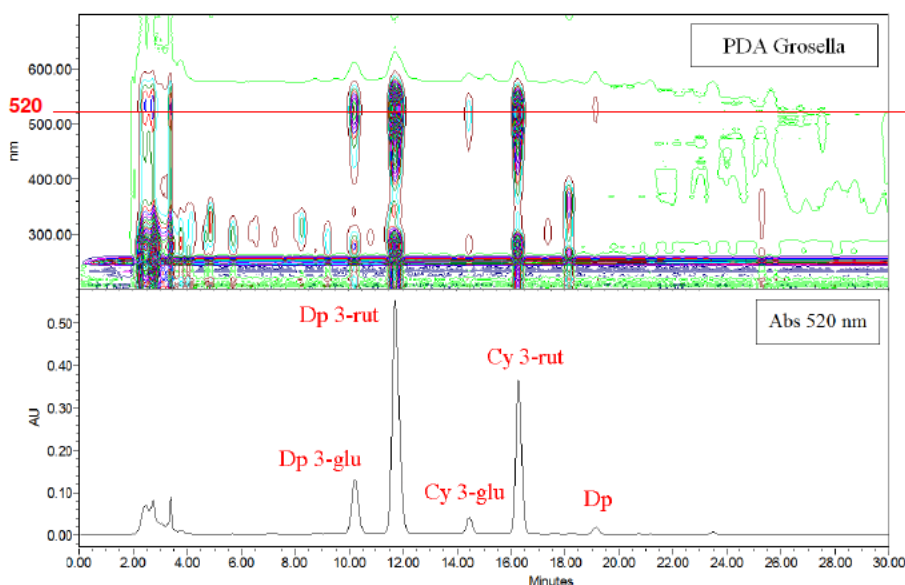


#### 4.1.2.5.- GROSELLA NEGRA (Blackcurrant; *Ribes nigrum* L.)

Para analizar la grosella negra se ha utilizado un zumo con 12,7 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Antocianos presentes en la grosella negra

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm de la grosella negra se muestra en la Figura 4.19.



**Figura 4.19:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la grosella negra.

La propuesta de identificación de la Figura 4.19, al no disponer de patrones de identificación de antocianos, ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía presentados en la Tabla 4.24.

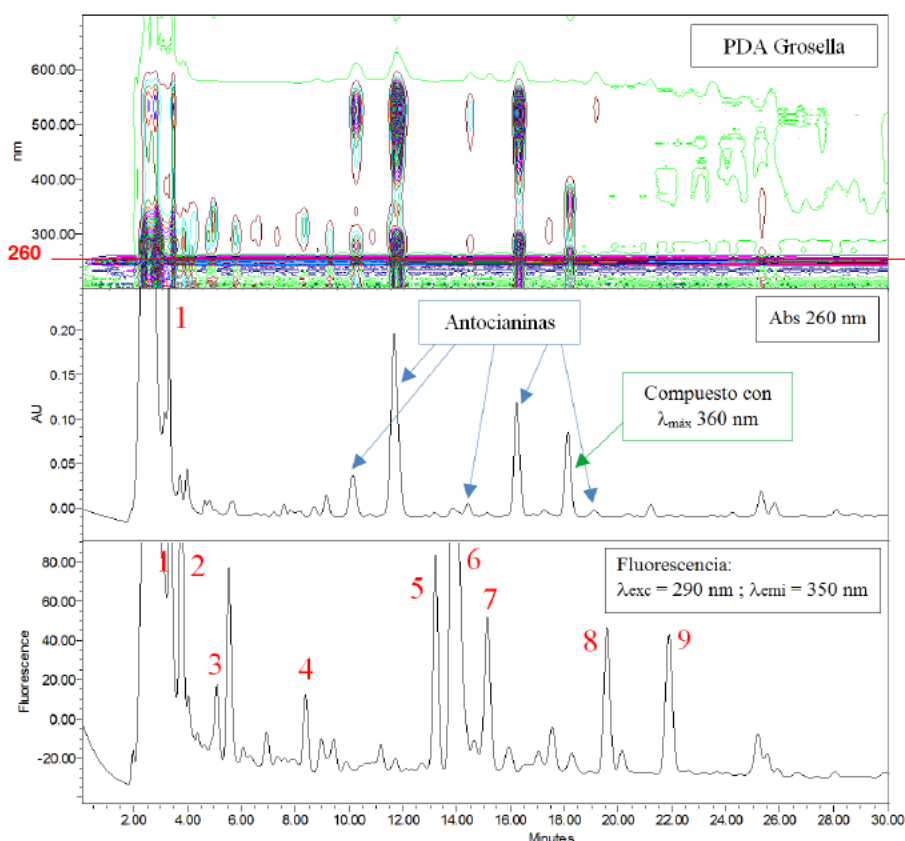
Podemos observar como la identificación de los antocianos en general coincide con la mayoría de las referencias consultadas aunque la base de datos Phenol-Explorer no identifica al antociano delfinidina y sí otros compuestos en pequeñas cantidades como son el pelargonidin-3-O-rutinósido, petunidin 3-O-rutinósido, petunidin 3-O-(6'' *p*-Cumaroil-glucósido) y cianidin 3-O-(6'' *p*-Cumaroil-glucósido), de las cuales solo alguno ha sido descrito por otros autores.

**Tabla 4.24:** Antocianos presentes en la grosella negra según la bibliografía.

<b>Antocianinas</b>	<b>Phenol-Explorer (mg/100g)</b>	<b>Stoj <i>et al.</i>, 2006 (mg/L)</b>	<b>Bermúdez-Soto <i>et al.</i> 2004 (g/L)</b>	<b>Nakajima 2004</b>	<b>Goiffon <i>et al.</i> 1999 (%)</b>	<b>Froytlog <i>et al.</i> 1998 (%)</b>
<u>Delphinidin</u>	--	--	0,06	--	--	--
<u>Delphinidin 3-O-glucósido</u>	86,68	--	1,15	X	16,4	12,9
<u>Delphinidin 3-O-rutinósido</u>	304,91	--	3,57	X	40,6	30,6
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	25,07	164	0,42	X	6,8	9,3
<u>Cianidin 3-O-rutinósido</u>	160,78	5633	2,55	X	36,0	43,6
Cianidin 3-O-(6'' <i>p</i> -Cumaroil- glucósido)	1,49	--	--	--	--	--
Peonidin 3-O-rutinósido	1,27	--	--	X	--	1,5
Malvidin 3-O-rutinósido	--	--	--	--	--	2,1
Malvidin 3-O-glucósido	--	--	0,52	--	--	--
Pelargonidin 3-O-rutinósido	2,48	--	--	--	--	--
Petunidin 3-O-rutinósido	4,09	--	--	--	--	--
Petunidin 3-O-(6'' <i>p</i> -Cumaroil- glucósido)	5,45	--	--	--	--	--

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la grosella negra**

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm tal y como se muestra en la Figura 4.20.



**Figura 4.20:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la grosella negra.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 2, 5, 6, 7 y 9), flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 4) y estilbenos (pico nº 8) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm en el cuál solo se logra identificar el compuesto numero 1 debido a la presencia de picos correspondientes con los antocianos y con otros compuestos con distinto máximo en su longitud de onda. El número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

En la Tabla 4.25 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.20, para lo cual se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.26.

**Tabla 4.25:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la grosella negra.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	0,32	320	271	Ácido gálico
2	3,8	--	300	259 - 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	5,2	--	80	280	(+)-Catequina
4	8,4	--	40	280	(-)-Epicatequina
5	13,3	--	80	238 - 274	Ácido siríngico
6	13,8	--	310	--	n.i.
7	15,2	--	50	--	n.i.
8	19,5	--	45	--	Resveratrol 3-glucósido
9	22,0	--	45	253 - 365	Ácido elágico

(n.i.) No identificado

Ninguna de las referencias consultadas llega a identificar 7 compuestos entre los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles y estilbenos. Phenol-Explorer recoge dos ácidos hidroxibenzoicos que aquí no se han detectado. Russell *et al*, 2009, detecta ácido vanílico además de gálico y 3,4 dihidroxibenzoico que sí se detectan en nuestro análisis. En lugar de ácido vanílico se detecta ácido elágico cuya presencia en la grosella negra ha sido descrita por Häkkinen *et al*, 1999.

Respecto a los flavan-3-oles monoméricos se han detectado los mismos que se describen en la base de datos Phenol-Explorer.

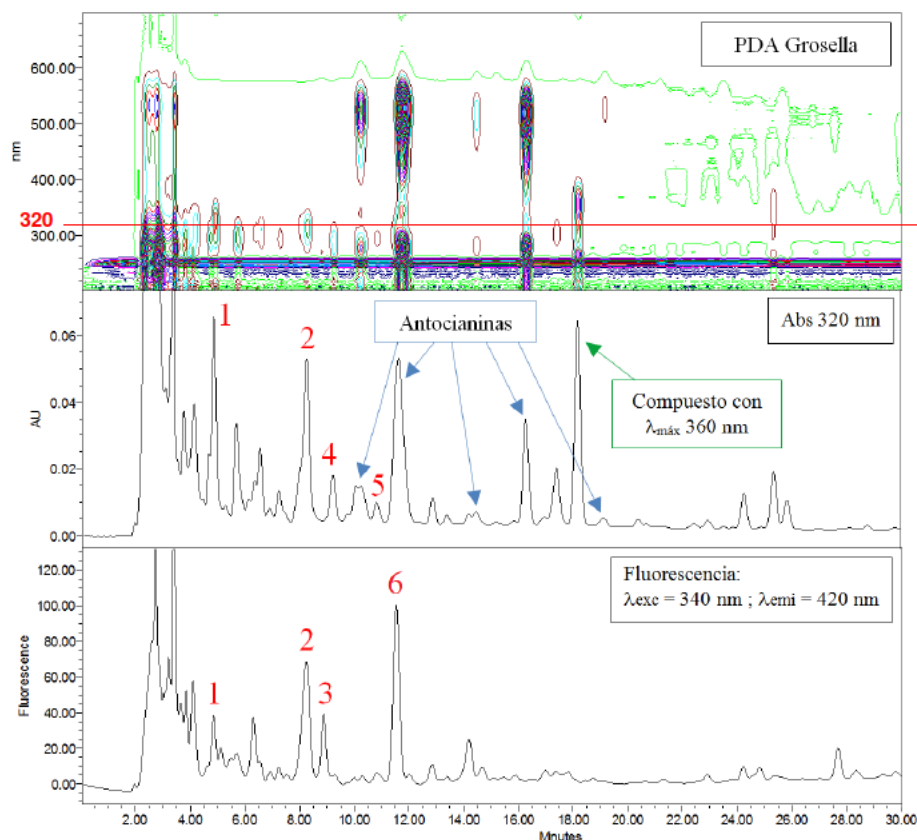
Por último, como estilbeno se ha encontrado resveratrol 3-glucosido, coincidiendo con resveratrol y piceido descrito por Huang & Mazza, 2011.

**Tabla 4.26:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la grosella negra según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA database (mg/100g)	Huang & Mazza 2011 (ng/g)	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS					
<u>Ácido gálico</u>	--	--	--	5,63	--
<u>Ácido 3,4-dihidroxibenzoico</u>	--	--	--	10,45	2,6
Ácido gálico 4-O-glucoside	0,10	--	--	--	--
Ácido vaníllico	--	--	--	15,01	--
Ácido 4 hidroxibenzoico 4-O-glucoside	0,73	--	--	--	--
<u>Ácido elágico</u>	--	--	--	--	2,3
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS					
<u>(+)-Catequina</u>	0,70	0,7	--	--	--
<u>(-)-Epicatequina</u>	0,47	0,47	--	--	--
ESTILBENOS					
Piceido	--	--	201,2	--	--
<u>Resveratrol</u>	--	--	58,6	--	--

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra

La Figura 4.21 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.



**Figura 4.21:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos de la grosella negra.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm ya que se logran identificar los compuestos 3 y 6 que en absorbancia no se detectaban.

En la Tabla 4.27 se recoge la identificación de los picos de la Figura 4.21. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.28.

**Tabla 4.27:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,8	0,06	40	--	Ácido cafeoil-quinico
2	8,2	0,05	70	314	Ácido <i>p</i> -Cumárico 4-O-quinico
3	8,9	--	40	--	n.i.
4	9,5	0,02	--	320	Ácido cafeico
5	11,5	--	100	--	Ácido ferúlico 4-O-glucosa
6	11,8	--	100	--	n.i.

(n.i.) No identificado

**Tabla 4.28:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en la grosella negra según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
Ácido ferúlico	--	--	--	3,1
<u>Ácido cafeico</u>	--	3,73	12,76	16,4
Ácido <i>p</i> -Cumárico	--	19,83	8,26	24,4
<u>Ácido ferulico 4-O-glucosa</u>	1,30	--	--	--
Ácido <i>p</i> -Cumárico 4-O-glucosa	0,51	--	--	--
Ácido clorogénico	0,13	--	--	--
<u>Ácido 3-cafeoil-quinico</u>	4,30	--	--	--
Ácido cafeico 3-glucósido	2,79	--	--	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumaroil-quinico</u>	1,73	--	--	--

Para confirmar la identidad de algunos compuestos se realizó la hidrólisis química como se indica en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Tras la hidrólisis de la grosella negra y con respecto al cromatograma de fluorescencia (Figura 4.21) se detecta que el pico número 2 (8,2 minutos; *p*-Cumaroil-quinico) desaparece y, simultáneamente, aparece un nuevo pico que se corresponde con el ácido *p*-Cumárico, identificado por el tiempo de retención de un patrón de éste ácido. Este resultado nos permite afirmar que el pico número 2 es ácido *p*-Cumaroil-quinico.

En los análisis realizados no se identifica el ácido ferúlico, si bien el pico nº 3 a los 8,9 min puede corresponder con un derivado de este ácido.

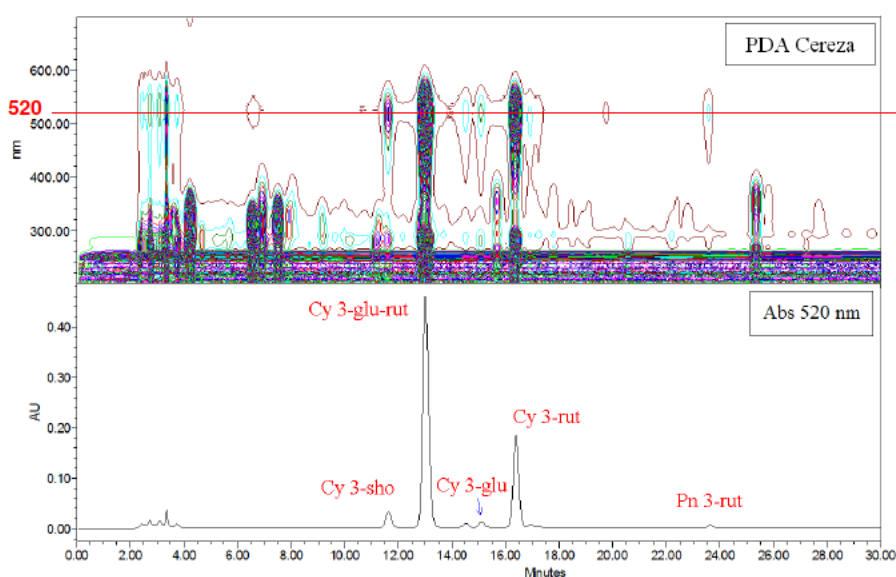
Todos los compuestos identificados han sido previamente descritos en esta fruta.

#### 4.1.2.6.- CEREZA (Sour cherry; *Prunus cerasus* L.)

La muestra de cereza analizada ha sido un zumo con 11,8 °Brix procedente de la casa comercial Mondifood (Bélgica).

##### ➤ Antocianos presentes en la cereza

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm de la cereza se muestra en la Figura 4.22.



**Figura 4.22:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la cereza.

La propuesta de identificación de la Figura 4.22 se realizó con los datos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.29, al no disponer de patrones de identificación de antocianos.

Podemos observar como todos los autores que han estudiado los antocianos de la cereza indican la presencia de cianidin 3-O-glucósido, cianidin 3-O-glucosil-rutinósido, peonidin 3-O-rutinósido y cianidin 3-O-rutinósido. Chaovanalikit & Wrolstad (2004), la base de datos Phenol-Explorer y Goiffon *et al.* (1999) establecen la identificación de los antocianos igual a la nuestra, aunque otros autores describen la presencia de otros antocianos que aquí no se han detectado.

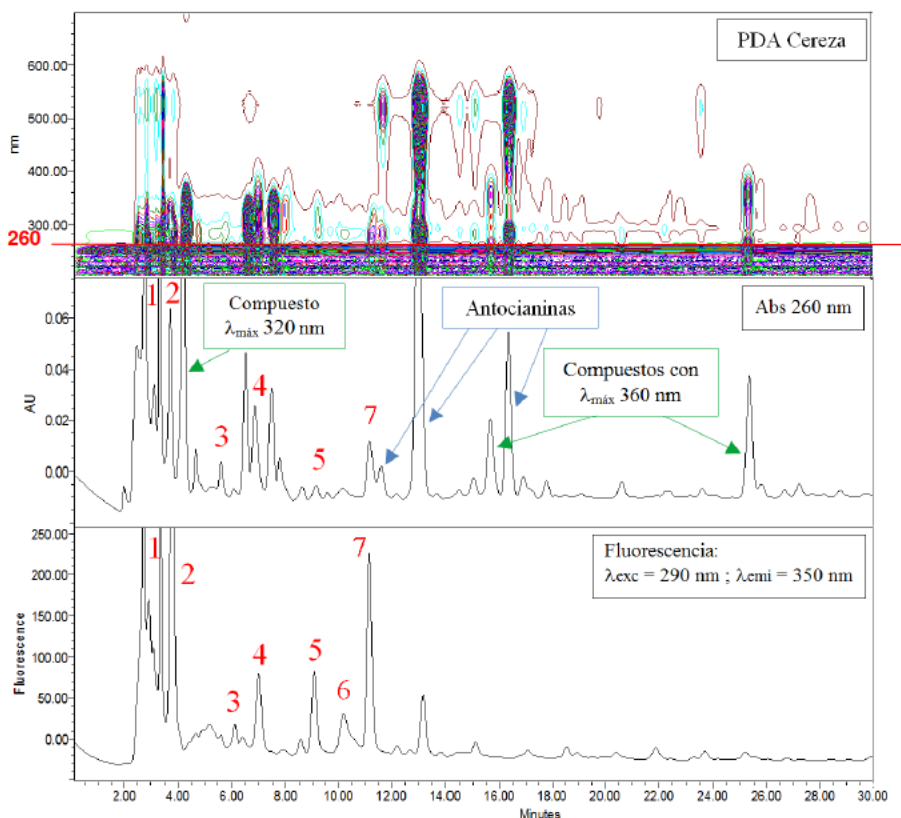


**Tabla 4.29:** Antocianos presentes en la cereza según la bibliografía.

Antocianinas	Phenol-Explorer (mg/100g)	Netzel <i>et al.</i> , 2007	Stintzing <i>et al.</i> 2006 (%)	Chaovanalikit & Wrolstad 2004 (%)	Mozetic <i>et al.</i> , 2004	Wrolstad <i>et al.</i> , 2005 (%)	Goiffon <i>et al.</i> 1999
<u>Cianidin 3-O-sophorósido</u>	--	--	--	3,42	--	X	X
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	1,12	--	--	3,34	X	8,05	X
<u>Cianidin 3-O-glucosil-rutinósido</u>	43,63	--	4	61,7	--	X	X
<u>Cianidin 3-O-rutinósido</u>	6,98	--	73,2	87,5	X	85,2	X
<u>Peonidin 3-O-rutinósido</u>	2,70	--	19,8	1,8	X	5,26	--
Delfinidin 3,5-O-diglucósido	--	X	--	--	--	--	--
Petunidin 3,5-O-diglucósido	--	X	--	--	--	--	--
Peonidin 3,5-O-diglucósido	--	X	--	--	--	--	--
Malvidin 3,5-O-diglucósido	--	X	--	--	--	--	--
Peonidin 3-O-glucósido	--	--	--	--	X	X	--
Pelargonidin 3-O-rutinósido	--	--	--	5,70	X	0,91	--
Pelargonidin 3-O-glucósido	--	--	--	--	--	0,56	--

### ➤ Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la cereza

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emi} = 350 \text{ nm}$  se muestran en la Figura 4.23.



**Figura 4.23:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la cereza.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 1, 2, 4, 5 y 7) y flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 6) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

En la Tabla 4.30 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.23. La identificación se realizó teniendo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1.

**Tabla 4.30:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la cereza.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	0,25	500	271	Ácido gálico
2	3,8	0,06	1200	260 – 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	6,1	0,01	20	280	(+)-Catequina
4	7	0,02	80	--	n.i.
5	9,0	0,005	80	--	n.i.
6	10,1	--	40	280	(-)-Epicatequina
7	11,3	0,02	230	260 - 292	Ácido vanílico

(n.i.) No identificado

**Tabla 4.31:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la cereza según la bibliografía.

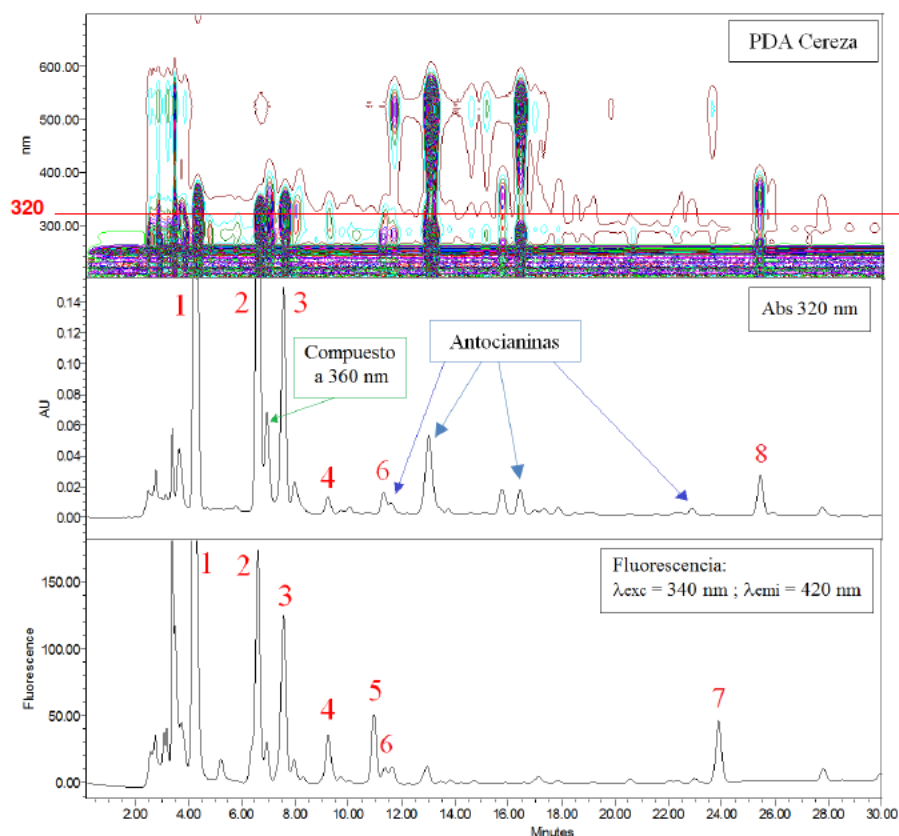
Identificación	USDA database (mg/100g)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 ( $\mu$ mol/100g) (*)	Robards & Antolovich 2007 (*)	Chaovanalikit & Wrolstad 2004	Tsanova-Savova <i>et al.</i> 2005 (%)	Wrolstad <i>et al.</i> , 2005
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS						
<u>(-)-Epicatequina</u>	3,83	11,5	X	X	6,8	X
<u>(+)-Catequina</u>	0,3	11,6	X	--	3,0	--

(\*) Cereza dulce

La bibliografía consultada y reflejada en la Tabla 4.31 no indica la presencia de ácidos hidroxibenzoicos en la cereza, tan solo de flavan-3-oles monoméricos como son la (+)-catequina y la (-)-epicatequina que nosotros también identificamos. Así, es la primera vez que se describen ácidos hidroxibenzoicos en la cereza.

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza

La Figura 4.24 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.



**Figura 4.24:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos de la cereza.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm ya que se logra la identificación de 7 de los 8 ácidos hidroxicinámicos identificados en total.

En la Tabla 4.32 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.24, para la cual se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1. Los resultados se contrastaron con las referencias bibliográficas recogidas en la Tabla 4.33.

**Tabla 4.32:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,2	0,55	350	325,5	Ácido neoclorogénico
2	6,5	0,35	170	310	n.i.
3	7,6	0,15	120	248 - 325	Ácido clorogénico
4	9,1	0,02	45	310	Ácido <i>p</i> -Cumárico-quínico
5	10,8	--	50	248 - 323	Ácido cafeico
6	11,4	0,02	10	--	n.i.
7	24,0	--	50	323	Ácido ferúlico
8	25,4	0,03	--	--	n.i.

(n.i.) No identificado

**Tabla 4.33:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en la cereza según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2012 (mg/100g)	Kirakosyan <i>et al.</i> , 2009	Jakobek <i>et al.</i> , 2007 (mg/kg) (*)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007 ( $\mu$ mol/100g) (**)	Chaovanalikit & Wrolstad 2004 (%)	Mozetic <i>et al.</i> , 2004	Wrolstad <i>et al.</i> , 2005
<u>Ácido cafeico</u>	--	--	--	9,05	--	--	--	--
Ácido <i>p</i> -Cumárico	--	--	--	19,12	--	--	--	--
<u>Ácido neoclorogénico</u>	7,2	--	Mayor	--	57,8	X	X	X
<u>Ácido 3`<i>p</i>-Cumaroil-quínico</u>	13,97	--	X	--	--	Mayor	X	X
<u>Ácido clorogénico</u>	19,1	3,19	--	--	6,7	X	--	X

(\*) Tras hidrólisis ácida

(\*\*) Cereza dulce

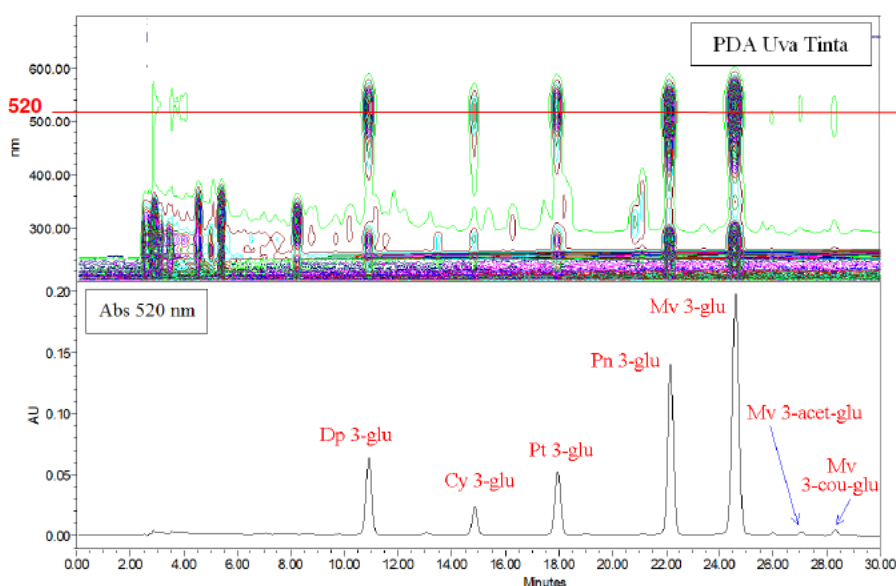
Al realizar la hidrólisis ácida del zumo de cereza se observó en el cromatograma la desaparición de los picos nº 2, 3 y 4, y apareció un nuevo pico correspondiente al ácido *p*-Cumárico.

#### 4.1.2.7.- UVA TINTA (Black grape; *Vitis vinifera* L.)

Para el análisis de uva tinta se ha utilizado un mosto tinto con 13 °Brix procedente de la casa comercial J. García Carrión S.A. (España).

##### ➤ Antocianos presentes en la uva tinta

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm de la uva tinta se muestra en la Figura 4.25.



**Figura 4.25:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la uva tinta.

La identificación de los picos de la Figura 4.25 se ha realizado comparando con los resultados descritos en estudios previos realizados por otros autores (Tabla 4.34), ya que no se disponía de patrones de antocianos.

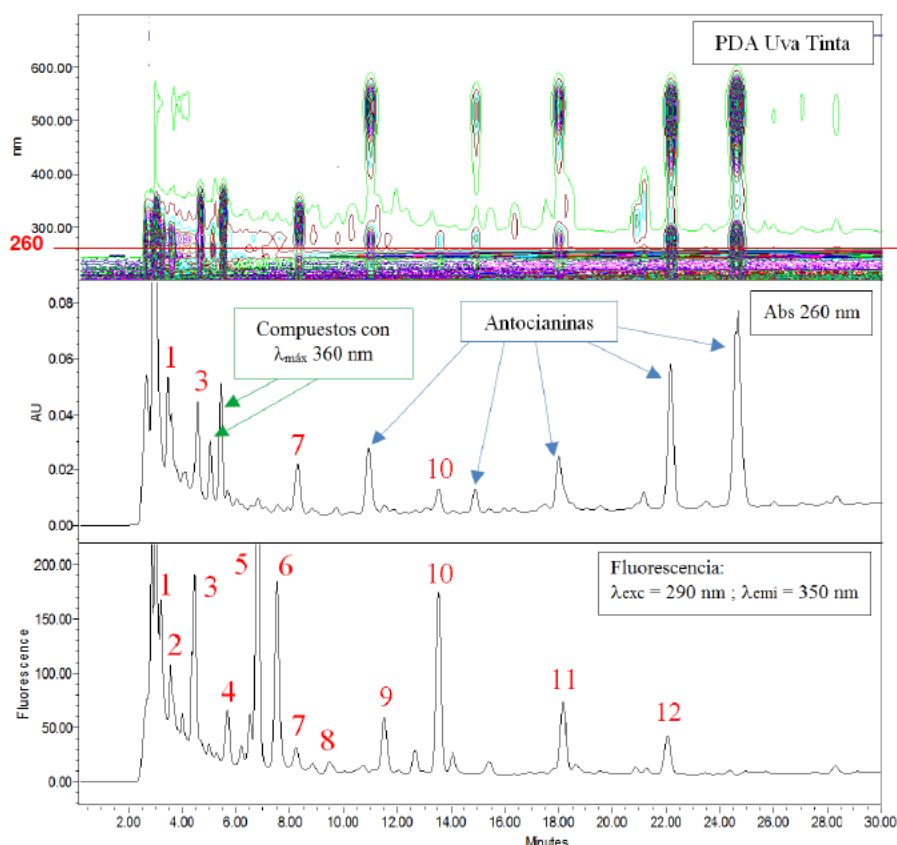
Podemos observar como autores como Wu & Prior 2005 y la base de datos Phenol-Explorer logran identificar más antocianos en la uva tinta que nosotros, del orden de 11 componentes, aunque la mayoría de ellos están presentes en muy bajas cantidades como por ejemplo petunidin 3-O-(6''-p-Coumaroyl-glucósido) con 0,05 mg/100 g o cianidin 3-O-(6''-p-Coumaroyl-glucósido) con 0,10 mg/100 g. El resto de autores se limita a identificar los 5 antocianos principales de la uva tinta que también se han identificado en el presente estudio.

**Tabla 4.34:** Antocianos presentes en la uva tinta según la bibliografía.

<b>Antocianinas</b>	<b>Phenol-Explorer (mg/100g)</b>	<b>Rodríguez-Medina <i>et al.</i>, 2009</b>	<b>Gómez-Alonso <i>et al.</i>, 2007 (%)</b>	<b>Kumazawa <i>et al.</i>, 2007 (μmol/100g)</b>	<b>Wu &amp; Prior; 2005</b>	<b>Goiffon <i>et al.</i>; 1999</b>
<u>Delphinidin 3-O-glucósido</u>	2,63	X	15,75	--	X	Menor
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	1,08	X	2,99	1,0	X	Menor
<u>Petunidin 3-O-glucósido</u>	2,76	--	11,97	--	X	Menor
<u>Peonidin 3-O-glucósido</u>	5,80	--	5,77	--	X	Menor
<u>Malvidin 3-O-glucósido</u>	39,23	--	37,37	3,9	X	Mayor
Delphinidin 3-cumaroilglucósido	--	--	--	--	X	--
Delphinidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	0,54	--	--	--	--	--
<u>Malvidin 3-O-(6''-acetolil-glucósido)</u>	9,66	--	--	--	X	--
Cianidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)	0,10	--	--	--	X	--
Petunidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)	0,05	--	--	--	X	--
Peonidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)	0,34	--	--	--	X	--
<u>Malvidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)</u>	9,91	--	--	--	X	--
Cianidin 3-O-galactósido	--	X	--	--	--	--
Cianidin 3-O-arabinósido	--	X	--	--	--	--
Cianidin 3-O-rutinósido	--	--	--	2,7	--	--
Malvidin 3,5-O-diglucósido	--	--	--	24,7	--	--

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la uva tinta**

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emi} = 350 \text{ nm}$ , se muestran en la Figura 4.26.



**Figura 4.26:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la uva tinta.

Si nos fijamos en el cromatograma de absorbancia obtenido a 260 nm, solo se han podido identificar 4 de los 12 compuestos correspondientes a ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. El resto de picos que se identifican en este perfil corresponden a antocianos y a otros compuestos cuyo máximo de absorción está en 360 nm. En cuanto al perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm y, además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.



En la Tabla 4.35 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.26. Para esta identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.36.

**Tabla 4.35:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la uva tinta.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,2	0,05	160	271	Ácido gálico
2	3,6	--	100	280	(-)-Epigallocatequina
3	3,8	0,05	180	259 - 294	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico
4	5,6	--	60	280	(+)-Catequina
5	6,8	--	400	--	n.i.
6	7,6	--	200	--	(-)-Epigallocatequina 3-O-galato
7	8,3	0,02	30	255	Ácido 4-hidroxibenzoico
8	9,5	--	10	280	(-)-Epicatequina
9	11,5	--	60	260 - 292	Ácido vanílico
10	13,4	0,01	180	238 - 274	Ácido sirínico
11	18,2	--	55	312	Resveratrol 3-O-glucosa
12	22,1	--	45	312	Resveratrol

(\*) No identificado (n.i.)

De los doce compuestos detectados se han identificado once, ocho de ellos ya están descritos en la uva tinta.

Tres de los cinco ácidos hidroxibenzoicos detectados ya estaban descritos en esta fruta sin embargo, no hay referencias de la presencia de los ácidos vanílico y sirínico que se describen aquí por primera vez.

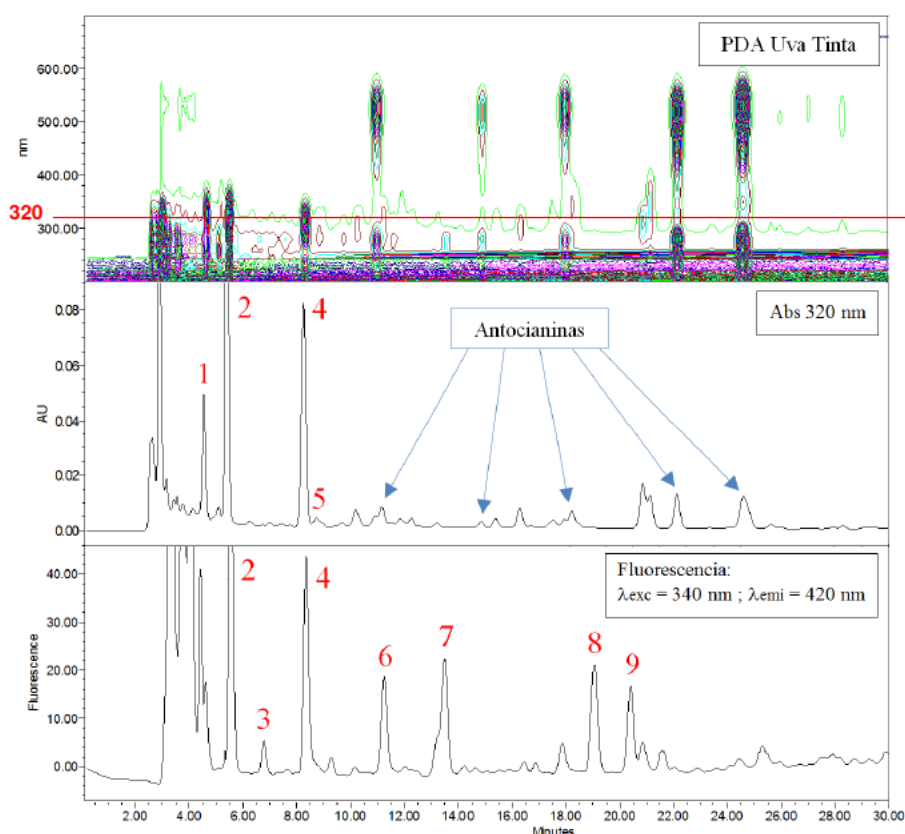
Respecto a los flavan-3-oles monoméricos se han identificado cuatro de los cinco que hay referenciados. Dentro de los estilbenos, se ha detectado resveratrol 3-O-glucósido cuando el número de estilbenos referenciados asciende a cinco en total.

**Tabla 4.36:** Ácidos hidroxibenzoicos flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la uva tinta según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA (mg/100g)	Piotrowska <i>et al.</i> , 2012 (ng/g)	Guerrero <i>et al.</i> , 2010	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> 2009	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Gruz <i>et al.</i> , 2008 (μg/L)	Gómez-Alonso 2007 (%)	Nacz & Shahidi 2006	Tsanova-Savova <i>et al.</i> 2005 (%)	Goiffon <i>et al.</i> 1999 (mg/L)	Robards & Antolovich, 1997
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS												
Ácido gálico	--	--	--	--	X	0,17	--	--	--	--	2,37	--
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	--	--	--	--	--	1,67	116	--	--	--	1,29	--
Ácido 4-hidroxibenzoico	--	--	--	--	--	1,20	74,3	--	--	--	--	--
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico 4-glucosa	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS												
(+)-Catequina	5,46	10,1	--	--	--	--	--	5,49	--	108	0,30	X
(-)-Epicatequina	5,24	8,68	--	--	--	--	--	2,30	--	87	--	X
(-)- Epigallocatequina 3-O-galato	1,68	2,81	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X
(+)-Gallocatequina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X
(-)- Epigallocatequina	0,03	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ESTILBENOS												
Resveratrol	0,15	--	1639	X	--	--	--	0,41	X	--	--	--
Resveratrol 3-O-glucósido	0,03	--	--	--	X	--	--	1,04	X	--	--	--
Piceatannol	5,2* 10 <sup>-3</sup>	--	374	X	--	--	--	--	--	--	--	--
Viniferin	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta

La Figura 4.27 recoge los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.



**Figura 4.27:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos de la uva tinta.

Para identificar los picos se tiene en cuenta el tiempo de retención y el espectro en ultravioleta visible de los patrones correspondientes.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm, y permite detectar un mayor número de compuestos.

En la Tabla 4.37 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.27. Los resultados obtenidos se contrastaron con los descritos en la bibliografía consultada que se muestran en la Tabla 4.38.

**Tabla 4.37:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,2	0,055	100	325,5	Ácido cafeoil-tartárico
2	5,5	0,16	10	243	n.i.
3	6,7	--	5	--	n.i.
4	7,7	0,08	40	248 - 325	Ácido clorogénico
5	8,8	0,01	--	310	Ácido <i>p</i> -Cumárico-tartárico
6	10,6	--	20	248 - 323	Ácido cafeico
7	12,8	--	25	--	n.i.
8	18,5	--	25	240 - 310	Ácido <i>p</i> -Cumárico
9	20,4	--	20	--	n.i.

(n.i.) No identificado

Los ácidos hidroxicinámicos identificados presentes en la uva tinta son acordes con los datos de la bibliografía, si bien, Gruz 2008 identifica la presencia de ácido ferúlico el cual nosotros no hemos logrado identificar.

**Tabla 4.38:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva tinta según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> 2009	Russell <i>et al.</i> , 2009 (mg/kg)	Gruz <i>et al.</i> , 2008 (µg/L)	Gómez-Alonso 2007 (%)	Nacz & Shahidi 2006	Tsanova-Savova <i>et al.</i> 2005 (%)	Goiffon <i>et al.</i> 1999 (mg/L)
<u>Ácido caftárico</u>	--	X	--	--	6,75	X	--	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumaroyl-tartárico</u>	0,56	X	--	--	--	--	--	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumárico</u>	--	--	--	--	--	--	--	0,42
<u>Ácido clorogénico</u>	--	--	--	847	--	--	--	--
<u>Ácido cafeico</u>	--	--	7,03	233	--	--	--	0,336
<u>Ácido cafeoil-tartárico</u>	1,13	--	--	--	--	--	--	--
Ácido ferúlico	--	--	--	153	--	--	--	0,49

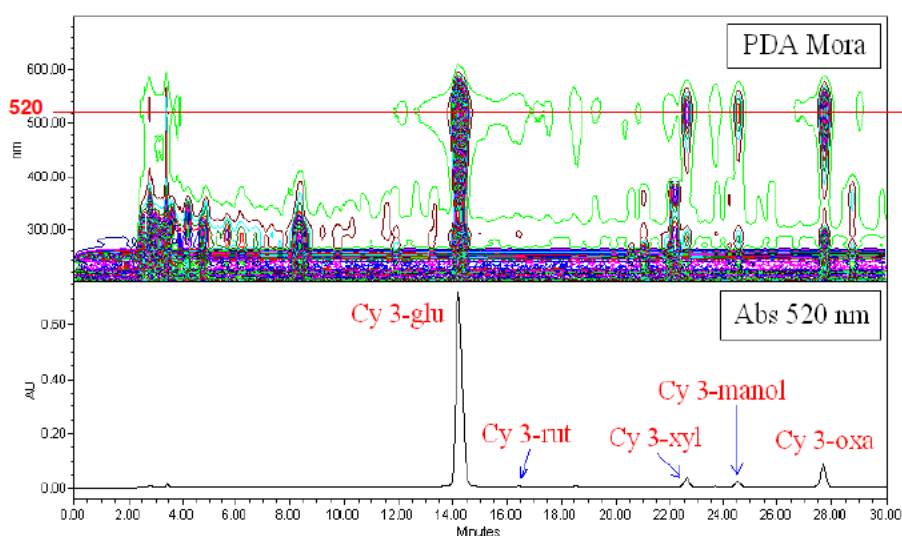
Tras la hidrólisis de la uva tinta, en el cromatograma de fluorescencia (Figura 4.27) se detecta que el pico número 2 (5,5 minutos) desaparece y se hidroliza a ácido cafeoil-tartárico (pico nº 1) como establece la base de datos de Phenol-Explorer.

#### 4.1.2.8.- MORA (Blackberry; *Rubus fruticosus* L.)

La muestra de mora analizada fue un puré con 11,1 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Antocianos presentes en la mora

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm de la mora se muestra en la Figura 4.28.



**Figura 4.28:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la mora.

La propuesta de identificación de la Figura 4.28, al no disponer de patrones de identificación de antocianos, ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía de la Tabla 4.39.

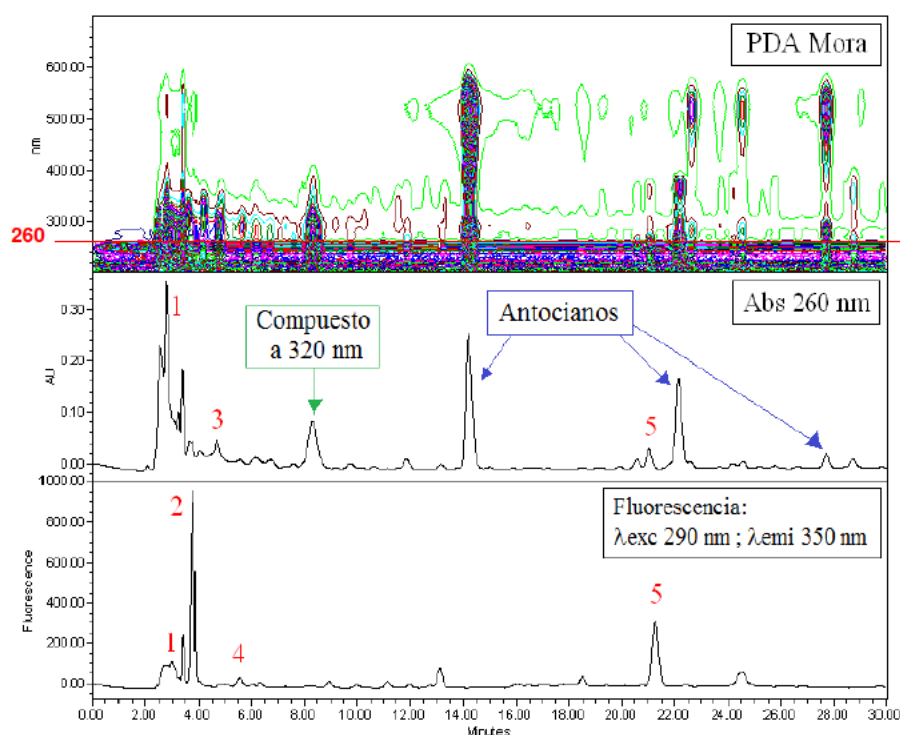
Podemos observar como todos los autores que han estudiado los antocianos de la mora indican la presencia de cianidin 3-O-glucósido como antociano mayoritario. La mayoría de autores establece que la mora se compone de tres o cinco antocianos. Nuestros resultados son concordantes con los descritos por la mayoría de los autores.

**Tabla 4.39:** Antocianos presentes en la mora según la bibliografía.

<b>Antocianinas</b>	<b>Phenol-Explorer (mg/100g)</b>	<b>Lee <i>et al.</i>, 2012</b>	<b>Gancel <i>et al.</i>, 2011 (mg/100g)</b>	<b>Acosta-Montoya <i>et al.</i>, 2010 (mg cy-glu eq/g)</b>	<b>Hassan &amp; Yousef, 2009</b>	<b>Fan-Chiang &amp; Wrolstad 2005</b>
<u>Cianidin 3-O-glucósido</u>	138,7	X	126,3	1,03	Mayor	X
<u>Cianidin 3-rutinósido</u>	8,86	X	--	--	--	X
<u>Cianidin 3-O-xilosido</u>	9,74	X	--	--	--	X
<u>Cianidin 3-O-(6''-malonyl- glucósido)</u>	4,30	X	11,73	0,11	--	X
<u>Cianidin 3-O-(6''diaxaly- glucósido)</u>	10,97	X	--	--	--	X

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la mora**

La Figura 4.29 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm.



**Figura 4.29:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la mora.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de dos de tres ácidos hidroxibenzoicos detectados (picos nº 1 y 5), también se detectan mejor los flavan-3-oles monoméricos (picos nº 2 y 4) que en el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm.

En la Tabla 4.40 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.29. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.41.

**Tabla 4.40:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la mora.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	0,40	200	271	Ácido gálico
2	3,8	--	1000	280	(-)-Epigallocatequina
3	4,8	0,06	--	259-294	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico
4	5,9	--	50	280	(+)-Catequina
5	21,3	0,05	400	253-365	Ácido elágico

Los resultados obtenidos en la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos son acordes a los que indica la bibliografía.

**Tabla 4.41:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la mora según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA (mg/100g)	Lee <i>et al.</i> , 2012	Gancel <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Acosta-Montoya <i>et al.</i> , 2010 (mg cy-glu eq/g)	Gasparotti <i>et al.</i> , 2010 (*)	Hager <i>et al.</i> , 2008 y Hager <i>et al.</i> , 2010.	Jakobek <i>et al.</i> , 2009	Tsanova-Sanova 2005 (%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS									
Ácido gálico	4,67	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido 4-hidroxibenzoico 4-glucósido	1,13	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico 4-glucósido	0,43	--	--	--	--	--	--	--	--
Ácido elágico	43,67	--	X	7,57	--	X	X	X	--
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS									
(+)-Catequina	0,72	37,1	--	--	--	--	X	--	20,9
(-)-Epigallocatequina	0,15	0,10	--	--	--	--	--	--	--
(-)-Epigallocatequina galato	--	0,68	--	--	--	--	--	--	--
(-)-Epicatequina	11,48	4,66	--	--	--	--	X	--	40,1

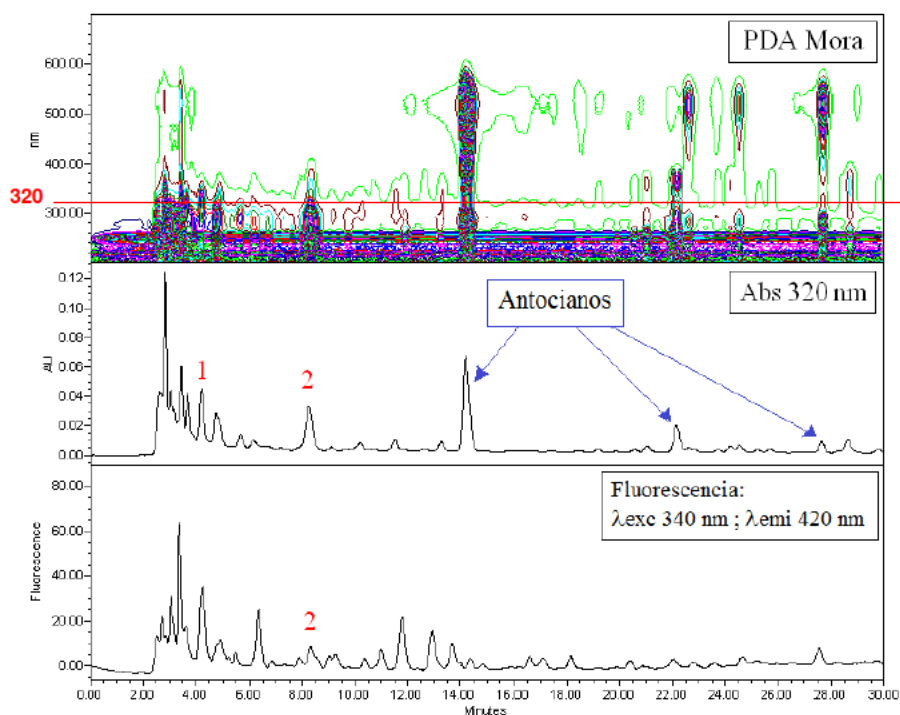
(\*) Tras hidrólisis

En la mayoría de los trabajos realizados por otros autores se detecta un menor número de compuestos. La base de datos Phenol-Explorer describe cuatro ácidos hidroxibenzoicos y tres flavan-3-oles monoméricos que coinciden con cuatro de los cinco compuestos identificados aquí.



### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la mora

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm se muestra en la Figura 4.30.



**Figura 4.30:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la mora.

Si nos fijamos en el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm se logran identificar dos compuestos, el resto de picos identificados corresponden a antocianos. En este caso, el perfil de fluorescencia no es muy útil en la identificación de este tipo de compuestos.

En la Tabla 4.42 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.30. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.43.

**Tabla 4.42:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la mora.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,2	0,04	--	310	Ácido cafeoil-quínico
2	8,2	0,04	10	310	Ácido <i>p</i> -Cumaroil quínico

La identificación obtenida se limita a dos compuestos al igual que Hassan & Yousef 2009 y Gasperotti *et al.* 2010 que logran la identificación de uno y tres compuestos respectivamente. Cabe destacar que la base de datos de Phenol-Explorer identifica un mayor número de ácidos hidroxicinámicos pero alguno de ellos como el ácido clorogénico o el ácido *p*-Cumaroil-glucosa, en bajas concentraciones.

**Tabla 4.43:** Ácidos hidroxicinámicos en la mora según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Gasperotti <i>et al.</i> 2010 (*)	Hassan & Yousef, 2009
Ácido cafeico	--	X	--
Ácido ferúlico	--	X	--
Ácido <i>p</i> -Cumárico	--	X	--
Ácido feruloil-glucosa	0,43	--	--
Ácido clorogénico	--	--	X
Ácido <i>p</i> -Cumaroil-glucosa	0,67	--	--
<u>Ácido 3-cafeoil-quínico</u>	4,53	--	--
Ácido 4-cafeoil-quínico	0,10	--	--
Ácido clorogénico	0,10	--	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumaroil-quinico</u>	0,37	--	--
Ácido cafeico 3-glucósido	0,50	--	--
Ácido <i>p</i> -Cumárico 4-O-glucosa	0,27	--	--

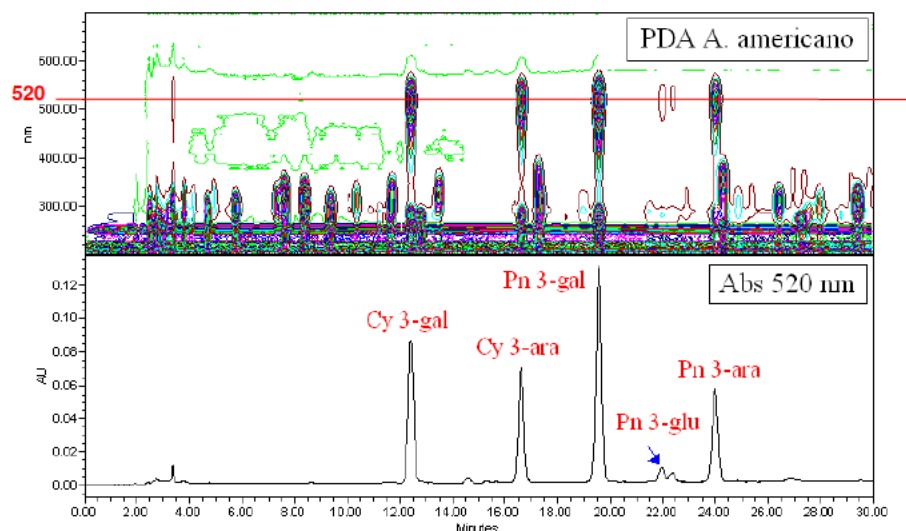
(\*) Tras hidrólisis

#### 4.1.2.9.- ARÁNDANO AMERICANO (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)

La muestra de arándano americano analizada fue un zumo concentrado con 63,1 °Brix procedente de la empresa Oceans Sprays (USA).

##### ➤ Antocianos presentes en el arándano americano

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenido a una absorbancia de 520 nm se muestra en la Figura 4.31.



**Figura 4.31:** Cromatograma general y perfil de antocianos del arándano americano.

La propuesta de identificación de la Figura 4.31 ha sido obtenida por comparación con los datos de la bibliografía (Tabla 4.44).

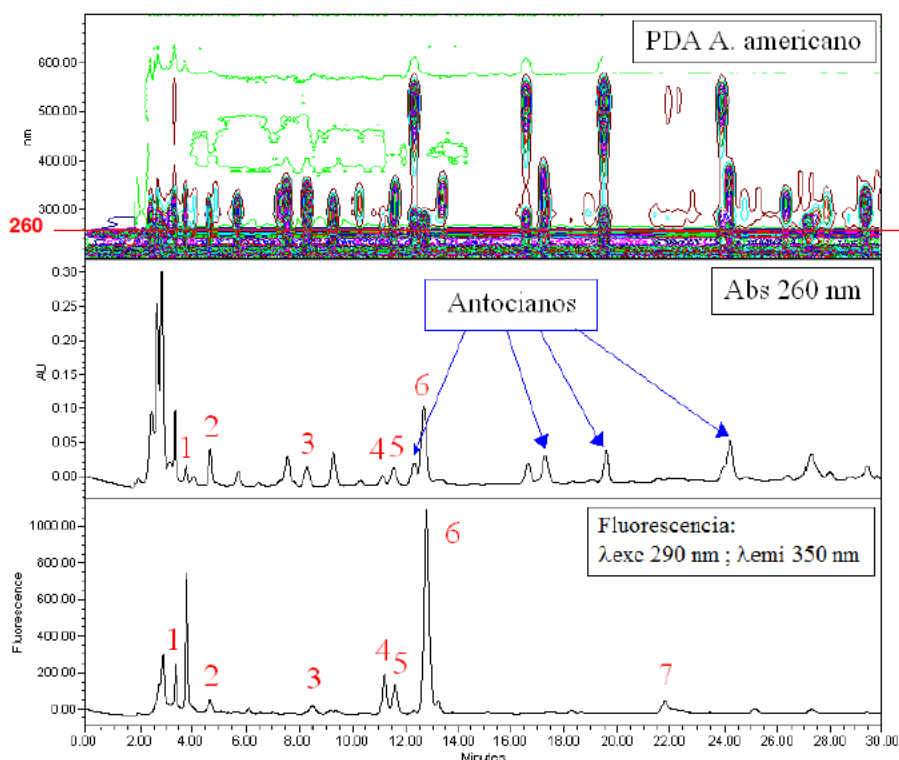
Podemos observar como todos los autores que han estudiado los antocianos del arándano americano indican la presencia de cianidin 3-O-galactósido, peonidin 3-O-galactósido y cianidin 3-O-arabinósido. Los otros dos antocianos detectados están incluidos en la base de datos Phenol-Explorer y también han sido descritos por otros autores. Nuestros resultados son concordantes con los descritos por la mayoría de los autores.

**Tabla 4.44:** Antocianos presentes en el arándano americano según la bibliografía.

Antocianinas	Phenol-Explorer (mg/100g)	Rodríguez- Medina <i>et al.</i> , 2009	Nacz & Shahidi 2006	Andersen 1989 (%)
Delphinidin 3-glucósido	--	X	--	Menor
Delphinidin 3-galactósido	--	--	--	Menor
<u>Cianidin 3-galactósido</u>	8,89	X	X	Menor
Cianidin 3-glucósido	0,74	X	--	38,3
<u>Peonidin 3-galactósido</u>	22,02	X	X	Menor
<u>Cianidin 3-arabinósido</u>	4,47	X	X	Menor
<u>Peonidin 3-glucósido</u>	4,16	--	--	41,9
Malvidin 3-glucósido	--	--	--	Menor
<u>Peonidin 3-arabinósido</u>	9,61	--	X	--

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del arándano americano**

La Figura 4.32 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos; que se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm.



**Figura 4.32:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos del arándano americano.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 2, 5, 6 y 7) y flavan-3-oles monoméricos (picos nº 1 y 4) que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

En la Tabla 4.45 se muestra la identificación de los picos de la Figura 4.32. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia con el espectro en ultravioleta visible de cada compuesto obtenido en el apartado 4.1.1, además de contrastar con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.46.

**Tabla 4.45:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el arándano americano.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,8	0,03	800	280	(-)-Epigallocatequina
2	4,6	0,05	50	259 y 294	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico
3	8,5	0,03	50	--	n.i.
4	11,2	0,01	200	280	(-)-Epicatequina
5	11,6	0,02	150	260 y 292	Ácido vanílico
6	12,8	0,15	1000	--	n.i.
7	21,7	--	100	--	Ácido elágico

(n.i.) No identificado

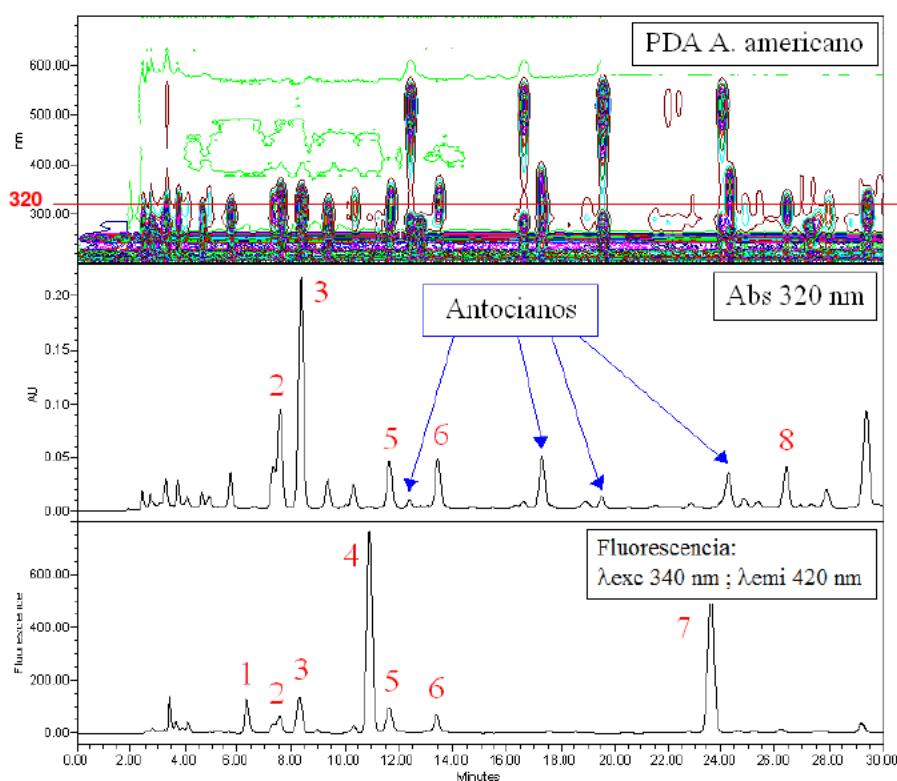
En los resultados de identificación obtenidos tres de los compuestos detectados están descritos previamente: (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina y ácido vanílico. La base de datos Phenol-Explorer y Wang 2011 establecen la presencia de ácido benzoico y otros derivados de éste aunque nosotros no lo hemos podido identificar. Dos flavan-3-oles monoméricos han sido previamente descritos. Respecto a la presencia de estilbenos no se logra identificar ninguno de los encontrados por otros autores.

**Tabla 4.46:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en el arándano americano según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	USDA (mg/100g)	Huang & Mazza 2011 (ng/g)	Wang <i>et al.</i> , 2011 (µg/mL)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> , 2009	Chen & Zou, 2007	Naczki & Shahidi 2006	Chen <i>et al.</i> , 2001 (mg/L)
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS								
Ácido vanílico	2,81	--	--	0,95	--	--	X	--
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,42	--	--	--	--	--	--	--
Ácido 3-hidroxibenzoico	0,41	--	--	--	--	--	--	--
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	0,80	--	--	--	--	--	--	--
Ácido benzoico	48,10	--	--	234	--	--	--	41
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS								
(+)-Catequina	--	0,39	--	2,86	X	X	--	8,1
(-)-Epicatequina	--	4,37	--	--	X	--	--	--
(-)-Epigallocatequina	--	0,74	--	--	--	--	--	--
(-)-Epigallocatequina galato	--	0,97	--	--	--	--	--	--
ESTILBENOS								
Resveratrol	--	--	--	0,45	--	--	--	--
Piceido	--	--	181,6	--	--	--	--	--

➤ **Ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano americano**

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos se muestran en la Figura 4.33. La identificación se hizo a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.



**Figura 4.33:** Perfiles de absorbancia y fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano americano.

Para la identificación de los picos de los perfiles se tiene en cuenta el tiempo de retención, el espectro en ultravioleta visible de los patrones correspondientes y los datos obtenidos por otros autores mostrados en la Tabla 4.48.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

**Tabla 4.47:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano americano.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	6,2	--	150	--	Ácido cafeico 4-O-glucósido
2	7,5	0,10	75	325	Ácido clorogénico
3	8,4	0,22	150	310	Ácido <i>p</i> -Cumaroil glucosa
4	11,0	--	800	--	Ácido cafeico
5	11,6	0,05	100	--	n.i.
6	13,4	0,05	75	324	Ácido ferúlico 4-O-glucosa
7	23,6	--	600	--	Ácido ferúlico
8	26,8	0,05	--	260	Ácido cinámico

(n.i.) No identificado

Todos los compuestos detectados han sido previamente descritos, aunque no todos por el mismo autor, como se puede observar en los datos recogidos en la Tabla 4.48.

**Tabla 4.48:** Ácidos hidroxicinámicos presentes en el arándano americano según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Wang & Zou, 2011 (µg/mL)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> , 2009	Nacz & Shahidi 2006	Chen <i>et al.</i> , 2001 (mg/L)
<u>Ácido <i>p</i>-Cumaroil glucosa</u>	--	--	X	--	--
<u>Ácido clorogénico</u>	--	--	X	--	X
<u>Ácido ferulico-glucosa</u>	--	--	X	--	--
<u>Ácido cafeoil glucosa</u>	--	--	X	--	--
Ácido sinápico	--	18	--	X	--
<u>Ácido cafeico</u>	2,31	0,95	--	X	--
Ácido <i>p</i> -Coumárico	1,08	10,8	--	X	X
<u>Ácido cinámico</u>	0,16	0,78	--	--	--
<u>Ácido ferúlico</u>	0,81	3,8	--	--	--

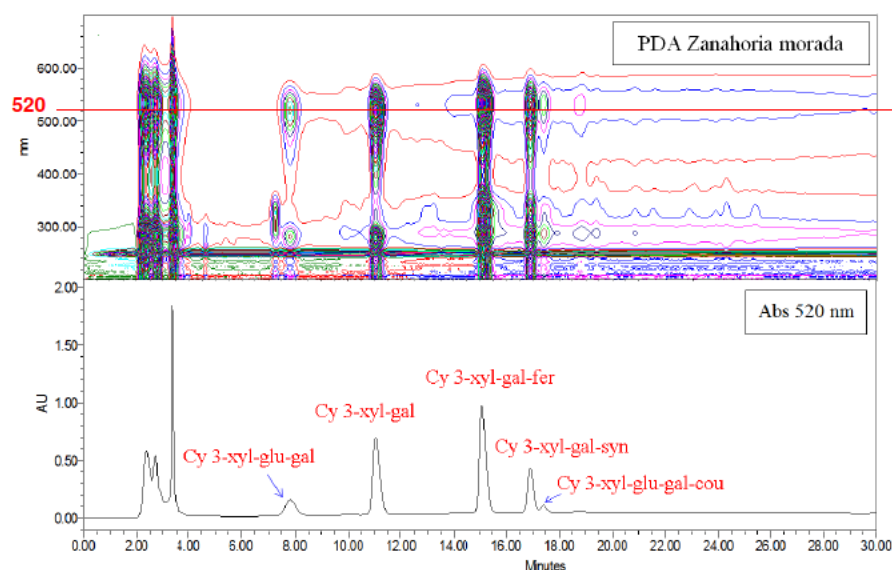


#### 4.1.2.10.- ZANAHORIA MORADA (Purple carrot; *Daucus carota* L.)

La muestra de zanahoria morada analizada fue un zumo con 14,1 °Brix procedente de la casa comercial GNT (Alemania).

##### ➤ Antocianos presentes en la zanahoria morada

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los antocianos a una absorbancia de 520 nm de la zanahoria morada se muestra en la Figura 4.34.



**Figura 4.34:** Cromatograma general y perfil de antocianos de la zanahoria morada.

La identificación de las antocianinas presentes en la zanahoria morada se realizó como en los casos anteriores atendiendo al espectro de cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma, al tiempo de retención y a los datos de la bibliografía de la Tabla 4.49.

Los autores referenciados han estudiado los antocianos de la zanahoria negra. En nuestro caso se trata de la zanahoria morada, aun así la tomamos como referencia para la identificación de los antocianos. Los autores indican la presencia de cianidin 3-xyloxyl glucosyl galactósido y cianidin 3-xyloxyl galactósido como antociano mayoritario, si bien, la mayoría de autores establece que la zanahoria se compone de cinco antocianos principalmente.

En conjunto, todos los antocianos detectados en la zanahoria morada ya han sido previamente descritos en la zanahoria negra.

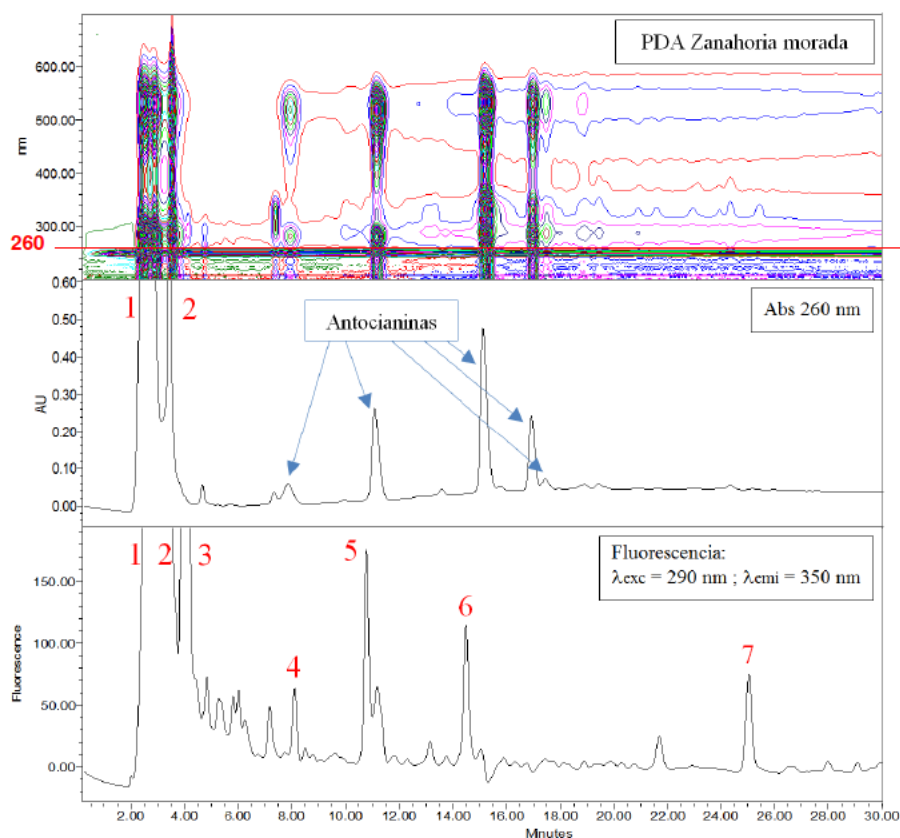
**Tabla 4.49:** Antocianos presentes en la zanahoria negra según la bibliografía.

<b>Antocianinas</b>	<b>Türkyilmaz <i>et al.</i> 2012 (*)</b>	<b>Sadilova <i>et al.</i>, 2007 (*)</b>	<b>Stintzing <i>et al.</i> 2006 (*)</b>	<b>Giusti 2003 (*)</b>	<b>Kammerer <i>et al.</i> 2003 (*)</b>
<u>Cianidin 3-xiloxil glucosil-galactósido</u>	X	X	X	X	Menor
<u>Cianidin 3-xiloxil-galactósido</u>	X	X	X	X	Menor
<u>Cianidin 3-xiloxil-galactósido-ferúlico</u>	X	X	X	--	Mayor
<u>Cianidin 3-xiloxil-galactósido-sinápico</u>	X	X	X	--	Menor
<u>Cianidin 3-xiloxil-glucosil galactósido- <i>p</i>-Cumárico</u>	X	X	X	--	Mayor

(\*) Datos para la zanahoria negra.

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la zanahoria morada**

La Figura 4.35 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos que se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{emi} = 350 \text{ nm}$ .



**Figura 4.35:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la zanahoria morada.

Para la identificación de los picos de los perfiles se tiene en cuenta el tiempo de retención, el espectro en ultravioleta visible de los patrones correspondientes y los datos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.51.

Si nos fijamos en el cromatograma de fluorescencia podemos observar como el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos que el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm, aunque no hemos logrado identificar nada más que tres de los seis picos detectados.

**Tabla 4.50:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en la zanahoria morada.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	3,4	1,40	1400	271	Ácido gálico
2	3,8	0,90	500	259 - 294	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
3	4,2	--	1100	--	n.i.
4	8,2	--	50	--	Ácido 4-hidroxibenzoico
5	10,5	--	170	--	n.i.
6	14,5	--	115	--	n.i.
7	25	--	75	--	n.i.

(n.i.) No identificado

Se han detectado los dos únicos ácidos hidroxibenzoicos descritos en esta fruta, además del ácido gálico y los cuatro que han quedado sin identificar.

**Tabla 4.51:** Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en la zanahoria negra según la bibliografía.

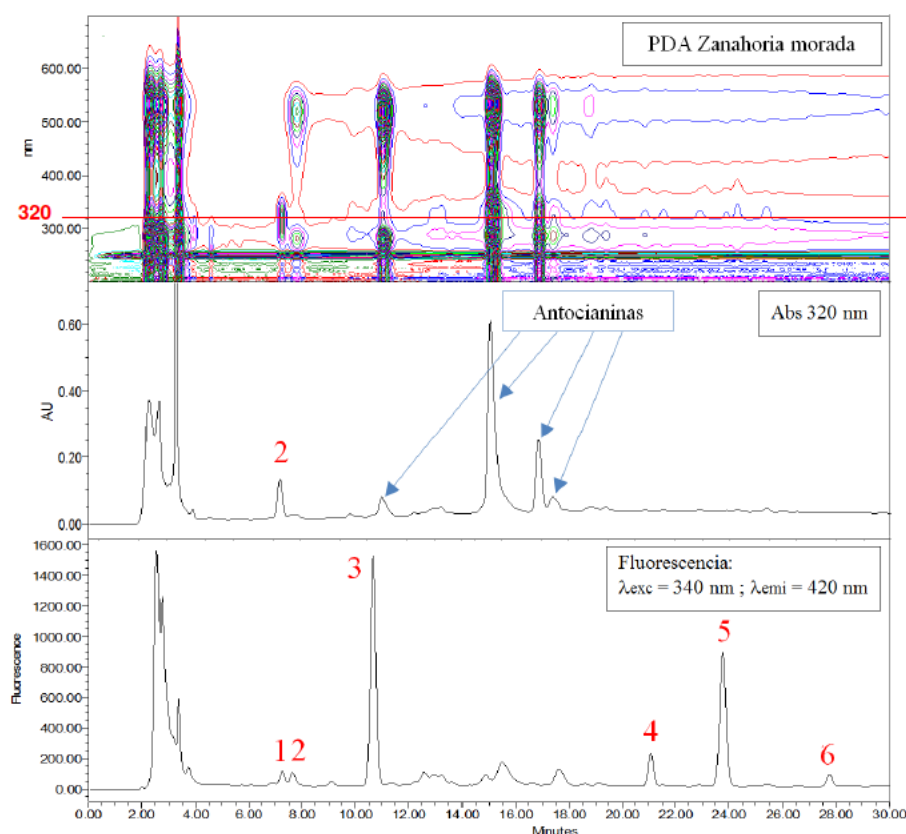
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g) (**)	Stintzing <i>et al.</i> , 2006 (*)
<u>Ácido 3,4 dihidroxibenzoico</u>	--	X
<u>Ácido 4-hidroxibenzoico</u>	0,05	--

(\*) Zanahoria negra

(\*\*) Zanahoria naranja

### ➤ Ácidos hidroxycinámicos presentes en la zanahoria morada

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxycinámicos se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm. El cromatograma general y los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 4.36.



**Figura 4.36:** Perfil de ácidos hidroxycinámicos de la zanahoria morada.

Para la identificación de los picos de los perfiles se tiene en cuenta el tiempo de retención, el espectro en ultravioleta visible de los patrones correspondientes y la bibliografía encontrada en la zanahoria negra mostrada en la Tabla 4.53.

Si nos fijamos en el perfil de fluorescencia éste es más específico para la identificación de los ácidos hidroxycinámicos que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm. Además, el número de compuestos que se detectan por fluorescencia es mayor y con una mejor señal.

**Tabla 4.52:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en la zanahoria morada.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	7,3	--	120	--	n.i.
2	7,6	0,16	110	248 - 325	Ácido clorogénico
3	10,5	--	1500	248 - 323	Ácido cafeico
4	18,5	--	230	240 - 310	Ácido <i>p</i> -Cumárico
5	24	--	900	248 - 323	Ácido ferúlico
6	27	--	100	247 - 324	Ácido sinápico

(\*) No identificado (n.i.)

Tres de los ácidos hidroxicinámicos encontrados ya han sido previamente descritos en la zanahoria negra. No se detecta la presencia de ácido dicaffeoyl-quínico tal y como indica Alasalvar *et al.*, 2001 ni de ácido sinápico. Si se detectan los ácidos clorogénico y cafeico.

**Tabla 4.53:** Ácidos hidroxicinámicos en la zanahoria negra según la bibliografía.

Identificación	Stintzing <i>et al.</i> , 2006 (*)	Giusti 2003 (*)	Kammerer <i>et al.</i> , 2003 (*)	Alasalvar <i>et al.</i> , 2001 (*)
<u>Ácido sinápico</u>	X	X	X	--
<u>Ácido ferúlico</u>	X	X	X	--
<u>Ácido <i>p</i>-Cumárico</u>	X	X	X	--
Ácido dicaffeoyl-quínico	--	--	--	X

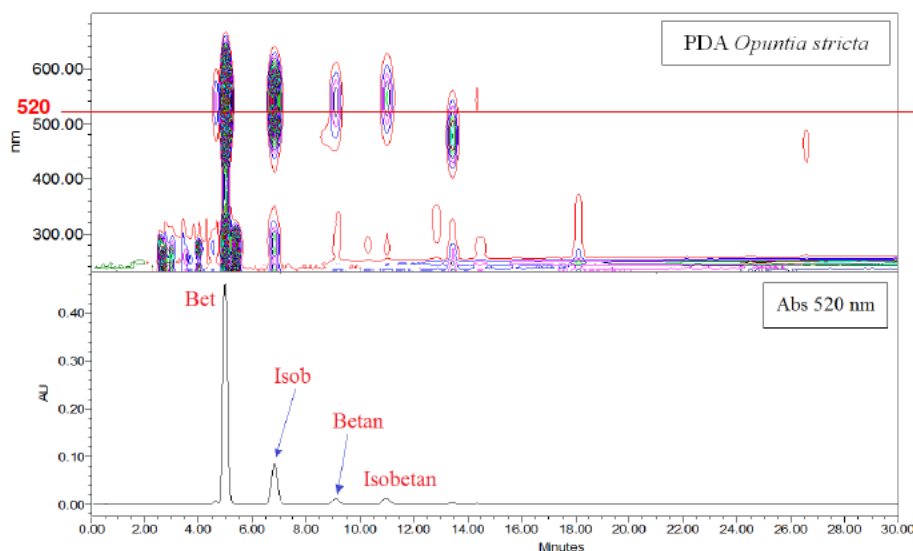
(\*) Datos para zanahoria negra

#### 4.1.2.11.- HIGO CHUMBO: *Opuntia stricta* Haw.

La muestra de *Opuntia stricta* analizada ha sido un zumo de 7,5 °Brix obtenido en el laboratorio de la UPCT.

##### ➤ Betacianinas presentes en *Opuntia stricta*

El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de betacianinas obtenido a una absorbancia de 520 nm se muestra en la Figura 4.37.



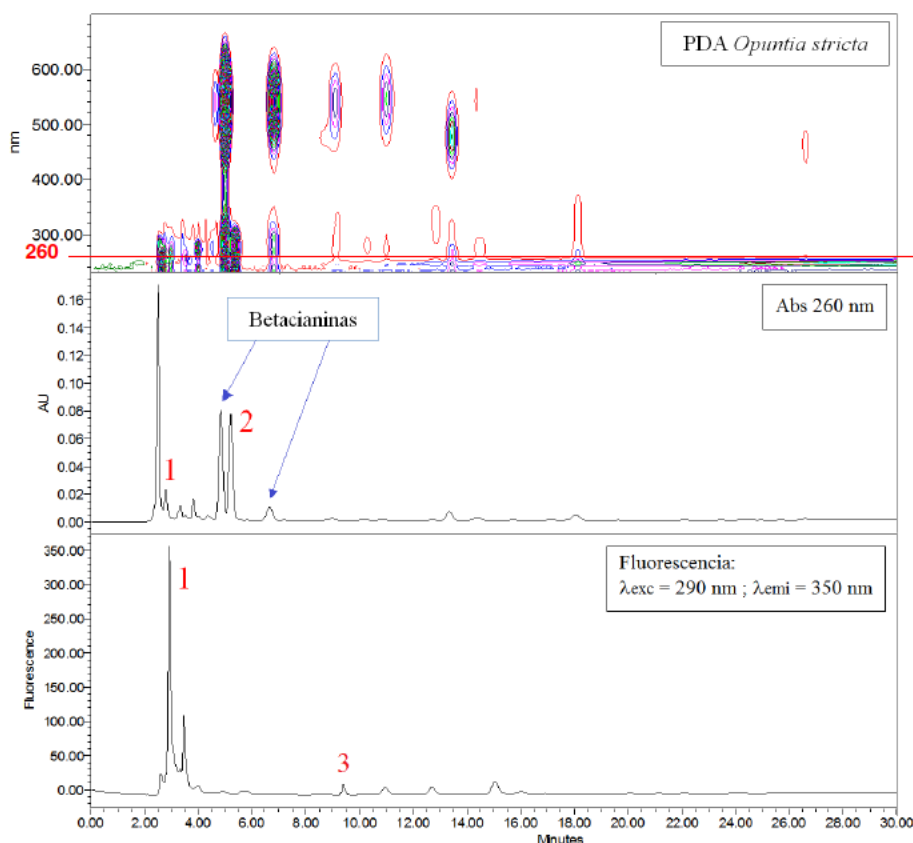
**Figura 4.37:** Cromatograma general y perfil de betacianinas presentes en *Opuntia stricta*.

Las betacianinas fueron identificadas a las mismas condiciones de detección que las antocianinas con el método de HPLC a 520 nm, aunque el máximo de absorción de éstas es a 535 nm.

La identificación de las betacianinas (Figura 4.37) presentes en los higos chumbos de *Opuntia stricta* se ha realizado atendiendo al espectro de cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma y a la información obtenida de trabajos previos publicados por Fernández-López *et al.* (2002 y 2007) y estuvo acorde con la bibliografía mencionada. Las betacianinas identificadas en esta fruta son: betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina.

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en *Opuntia stricta***

Los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se identifican a una absorbancia de 260 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm, y se muestran en la Figura 4.38.



**Figura 4.38:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de *Opuntia stricta*.

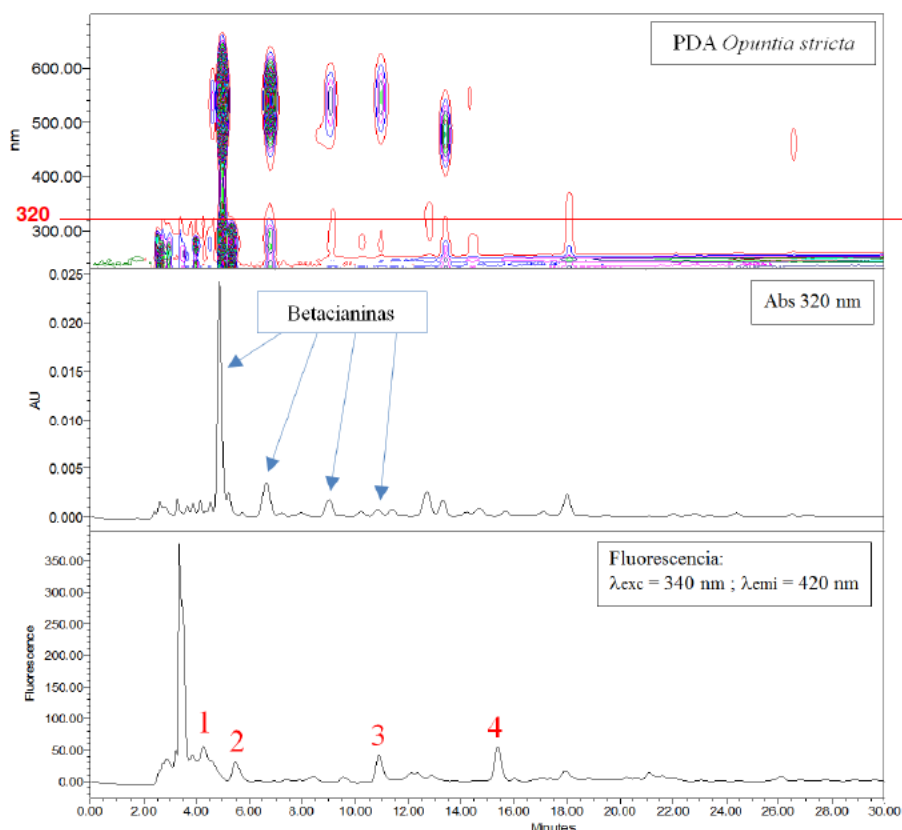
Si nos fijamos en el perfil de absorbancia a 260 nm, se logra la identificación de dos compuestos mientras que el perfil de fluorescencia no es muy resolutivo.

La propuesta de identificación de los compuestos es la presencia de (1) ácido gálico, (2) no identificado y (3) (-)-epicatequina, y cantidades muy pequeñas de otros compuestos del grupo de los ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles monoméricos. Los datos obtenidos son semejantes a la composición de *Opuntia dillenii* (Chang *et al.*, 2008).



➤ **Ácidos hidroxicinámicos presentes en *Opuntia stricta***

La Figura 4.39 muestra los perfiles cromatográficos del espectro de absorción y del espectro obtenido por fluorescencia de los ácidos hidroxicinámicos que se identifican a una absorbancia de 320 nm y unas condiciones de fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 340$  nm y  $\lambda_{emi} = 420$  nm.



**Figura 4.39:** Perfil de ácidos hidroxicinámicos de *Opuntia stricta*.

Para la identificación de los picos de los perfiles se tiene en cuenta el tiempo de retención y el espectro en ultravioleta visible de los patrones correspondientes.

En este caso el perfil obtenido con el detector de fluorescencia es más específico para la identificación de los ácidos hidroxicinámicos que el perfil obtenido por absorbancia a 320 nm en el cual los picos que aparecen corresponden con betacianinas.

Además, para tratar de identificar el mayor número de compuestos posible se realizó la hidrólisis de la muestra. Cabe destacar que tras este tratamiento apareció más cantidad de ácido cafeico y el pico n° 1 desapareció. Además, todos los zumos analizados mantuvieron su color rojo intenso tras dicho tratamiento menos el zumo de

*Opuntia stricta* el cuál, al contener betalaínas, pasó a dar un color amarillo pálido. Esto significa que los antocianos no fueron hidrolizados tras este tratamiento, mientras que las betalaínas si lo fueron.

**Tabla 4.54:** Detección e identificación de ácidos hidroxicinámicos presentes en *Opuntia stricta*.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Fluorescencia 420 nm (UE)	Espectro de absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,2	--	50	325,5	Ácido cafeoil-tartárico
2	5,5	--	40	--	n.i.
3	10,5	--	45	248 - 323	Ácido cafeico
4	15,2	--	50	--	n.i.

(n.i.) No identificado

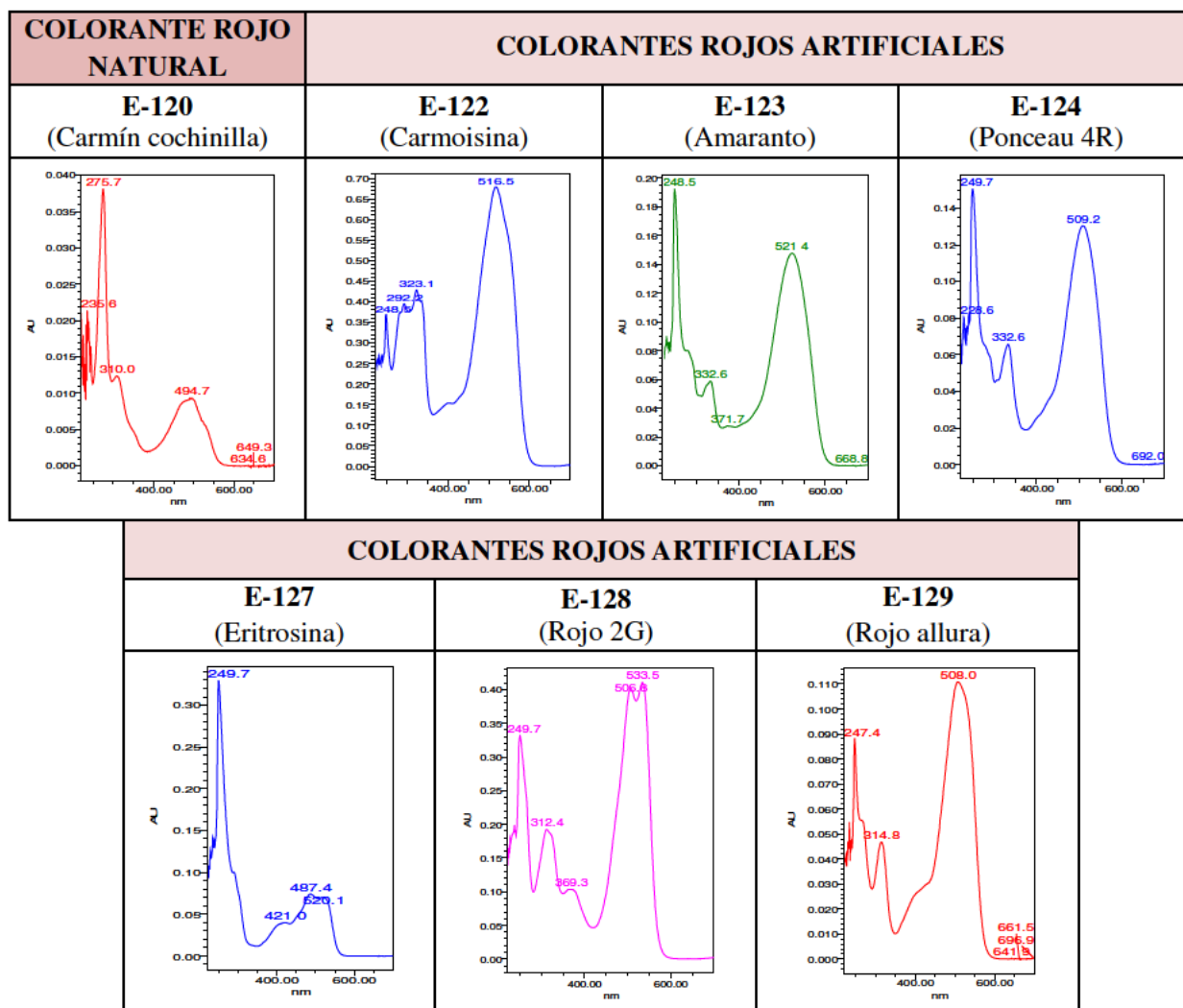
La identificación de los ácidos hidroxicinámicos se realizó exclusivamente mediante el cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia. Aun así 2 de los 4 compuestos no se lograron identificar.

### 4.1.3.- Perfil por HPLC de colorantes rojos alimentarios

Como ya se ha mencionado anteriormente, se analizaron distintos colorantes rojos naturales y artificiales habitualmente utilizados en la elaboración de bebidas y refrescos y que, además, pueden ser adicionados de forma fraudulenta a los zumos y bebidas de frutas rojas.

El objetivo ha sido poder detectar e identificar estos compuestos con el procedimiento de análisis propuesto en el apartado 4.1.1. Así, se estudiaron los espectros de absorbancia y de fluorescencia de un colorante rojo natural y de seis colorantes rojos artificiales.

Los espectros de absorbancia en UV-Visible obtenidos de los colorantes rojos estudiados se muestran en la Figura 4.40.



**Figura 4.40:** Espectros individuales de absorbancia en UV-Visible de los colorantes rojos artificiales y naturales analizados.

En cuanto a los espectros de fluorescencia, los resultados obtenidos mostraron que este grupo de colorantes rojos no posee una fluorescencia significativa para su posible detección por este método, por lo que se van a detectar por absorbancia.

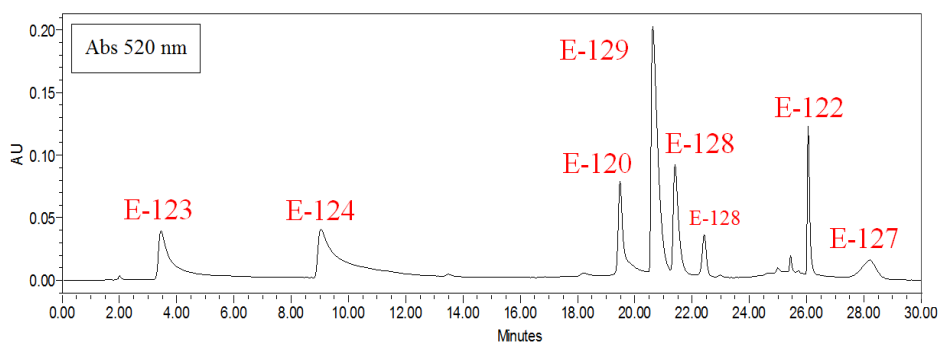
Los resultados del análisis por HPLC de cada colorante se muestran en la Tabla 4.55 que incluye el código E de cada uno, la máxima longitud de onda que alcanzan y el tiempo de retención al que aparecen en el cromatograma.

**Tabla 4.55:** Nomenclatura, longitud de onda máxima de absorción y tiempo de retención de los colorantes rojos alimentarios estudiados.

Identificación	Colorantes estudiados	UV-Visible ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (nm)	Tiempo de retención (minutos)
<b>COLORANTE ROJO NATURAL</b>			
E-120	Carmín cochinilla (Cochineal)	494,7	19,3
<b>COLORANTES ROJOS ARTIFICIALES</b>			
E-122	Carmoisina (Azorubine)	516,5	26,2
E-123	Amaranto (Amaranth)	521,4	3,5
E-124	Ponceau 4R	509,2	9,0
E-127	Eritrosina (Erythrosine)	520,1	28,2
E-128	Rojo 2G (Red 2G) <b>No permitido</b>	533,5	21,5 y 22,2
E-129	Rojo allura (Allura red)	508,0	20,8

Además del análisis individual de cada colorante, se preparó una mezcla con todos ellos a una concentración de 0,5 mg/mL en agua ya que, tanto los colorantes rojos artificiales como el colorante natural analizado, son solubles en agua. La longitud de onda seleccionada para la detección de esta mezcla fue a 520 nm debido al compromiso de unificar las máximas longitudes de onda de los diferentes colorantes rojos estudiados: cochinilla (495 nm), carmoisina (516 nm), amaranto (521 nm), ponceau 4R (509 nm), eritrosina (520 nm), rojo 2G (533 nm) y rojo allura (508 nm); y a que es la longitud de onda de detección de los antocianos.

La Figura 4.41 muestra el cromatograma a 520 nm de la mezcla de colorantes rojos.



**Figura 4.41:** Perfil de absorbancia a 520 nm de los colorantes rojos artificiales.

Todos los compuestos analizados aparecen bien resueltos en el cromatograma a 520 nm. El primer colorante en eluir es el amaranto (E-123) a los 3,5 minutos, mientras que la eritrosina (E-127) es el colorante que sale último a los 28,2 minutos. Cabe destacar la aparición de un doble pico para el caso del Rojo 2G (E-128) a los 21,4 y 22,5 minutos.

Estos compuestos, de estar presentes en un zumo o bebida de fruta, se detectarían junto con los antocianos en el perfil de compuestos obtenidos a 520 nm. Se tiene así una información adicional que contribuye a autenticar el origen de zumos y bebidas de frutas rojas.

#### **4.1.4.- Recopilación de los datos de antocianos, betalainas, colorantes rojos alimentarios, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos identificados en las frutas rojas estudiadas**

Dada la gran cantidad de datos generados en el análisis de las frutas, se hace aquí un resumen que recopila los compuestos detectados en cada fruta. Los datos se han recogido en dos tablas que serán de gran utilidad para los productores de bebidas y zumos de fruta.

##### **- Antocianos y betalainas**

La identificación de los antocianos y betalainas presentes en las frutas rojas ha sido obtenida mediante comparación de los datos obtenidos en los cromatogramas a 520 nm de absorbancia y con los datos descritos en la bibliografía. La gran diversidad de compuestos rojos existente en las frutas rojas y a la no comercialización de muchos de ellos como patrón, ha llevado a este modo de identificación.

Los antocianos, las betalainas y los colorantes rojos alimentarios se resumen en la Tabla 4.56. La presencia de un compuesto en una determinada fruta se marca en la Tabla con una cruz, y la cantidad de cada antociano o betalaina en cada zumo se indica en correlación con el número de cruces mostradas. Así, los componentes mayoritarios en cada zumo de fruta están marcados con XXX, mientras que los que se encuentran en una menor cantidad se indican X. Además, en la Tabla 4.56 se indica el tiempo de aparición de los compuestos identificados y su tiempo de retención relativo con respecto a un estándar interno (pelargonidina 3-O-glucosido). Los cálculos para determinar el tiempo de retención relativo de cada compuesto se refirieron al tiempo de retención de la pelargonidina 3-O-glucósido, usada como patrón.

En total se identificaron 38 antocianos y betalainas presentes en los 11 zumos de frutas rojas analizados. Puede apreciarse como cada zumo de fruta tiene algún antociano o betalaina característico en su perfil cromatográfico el cual es útil como “huella dactilar”. Estos compuestos específicos quedan resaltados en la Tabla 4.56 en color gris y son los siguientes:

- Fresa: se identificaron tres antocianos, siendo el más característico el pelargonidin 3-O-glucósido.

- Frambuesa: se identificaron cinco antocianos siendo los más característicos cianidin 3-O-sophorósido y pelargonidina 3-O-sophorósido.
- Mirtilo: se identificaron un total de 14 antocianos de los cuales cinco son los más característicos: delphinidin 3-O-galactósido, delphinidin 3-O-glucósido, cianidin 3-O-glucósido, petunidin 3-O-glucósido y malvidin 3-O-glucósido.
- Arándano europeo: se identificaron cinco antocianos, siendo el más característico el cianidin 3-O-galactósido. El perfil del arándano europeo queda enmascarado en presencia de mirtilo, lo cuál deberá tenerse en cuenta al analizar las mezclas de ambas frutas.
- Grosella negra: se identificaron cinco antocianos de los cuales dos son los característicos: delphinidin 3-O- rutinósido y cianidin 3-O-rutinósido.
- Cereza: se identificaron cinco antocianos. El más característico es el cianidin 3-O-glucosil-rutinósido.
- Uva tinta: se identificaron siete antocianos de los cuáles dos son los más característicos: peonidin 3-O-glucósido y malvidin 3-O-glucósido.
- Mora: se identificaron cinco antocianos principales siendo cianidin 3-O-glucósido el principal de todos ellos.
- Arándano americano: se identificaron cinco antocianos y el más representativo es peonidin 3-O-galactósido.
- Zanahoria morada: se identificaron un total de cinco antocianos. El más característico es el cianidin 3-O-xilosil-galactósido-ferúlico.
- *Opuntia stricta*: se caracteriza por la presencia de betacianinas y destaca la betanina.

Los datos obtenidos de cada una de las frutas rojas estudiadas son de gran utilidad para la industria de zumos y su control de calidad debido a que la información obtenida permitirá identificar de qué fruta procede un producto y sus posibles adulteraciones. Por ejemplo, la identificación de la fresa en una mezcla de zumos puede descubrirse por la presencia de pelargonidina 3-O-glucósido. El análisis de la frambuesa se caracteriza por contener cianidin 3-O-sophorósido y pelargonidina 3-O-sophorósido, y la cereza por

contener cianidin 3-O-glucosil-rutinósido. Sin embargo, una mezcla de estas frutas puede causar dificultades en su identificación. Si bien, la detección de pelargonidina 3-O-sophorósido indica la presencia de la frambuesa. En el caso del mirtilo, éste presenta un perfil inequívoco de antocianos caracterizado por la presencia de delphinidina 3-O-arabinósido. El arándano europeo se caracteriza por la presencia de cianidin 3-O-galactósido y el arándano americano por la presencia de peonidin 3-O-galactósido que solo se encuentra presente en el mirtilo. Así, una concentración pequeña de arándano europeo o americano en una mezcla con mirtilo sería muy difícil de detectar. El análisis de la grosella negra es inequívoco caracterizado por la presencia de delphinidina 3-O-rutinósido, la uva tinta destaca por la presencia de peonidina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-glucósido, la zanahoria morada por cianidin 3-O-xyloxygalactósido-ferúlico. La mora destaca por la presencia de cianidin 3-O-glucósido, compuesto presente en la mayoría de las frutas rojas estudiadas, por lo que su identificación en una mezcla zumo con alguna de estas frutas sería difícil de detectar. Si bien, la mora es la única de las frutas estudiadas con presencia de cianidin 3-O-xilosido y cianidin 3-O-(6''-malonyl-glucósido). En cuanto a los frutos de Opuntia stricta se caracterizan por la presencia de betalaínas en lugar de antocianos.

#### **- Colorantes rojos alimentarios**

Los colorantes rojos alimentarios estudiados se han incluido en también en la Tabla 4.56 de manera que un total de 45 compuestos han sido identificados a la longitud de onda de 520 nm. Se obtuvieron diferentes tiempos de retención relativos para cada compuesto a excepción de la betanidina y ponceau 4R, con un tiempo de retención relativo de 0,49; cianidin 3-O-xyloxygalactósido e isobetanidina, con 0,61; y cianidin 3-O-xyloxygalactósido-ferúlico y petunidina 3-O-galactósido con 0,84 (remarcados en las Tablas 4.56 y 4.57). En estos tres casos las diferencias del espectro de absorbancia de los compuestos son evidentes, por lo que no hay problemas para su identificación. Hay casos en los que los tiempos de retención de los compuestos están muy próximos entre sí, en estos casos la diferenciación del espectro es útil para la identificación del compuesto.



**Tabla 4.56:** Antocianos, betalainas y colorantes rojos alimentarios identificados.

Compuestos	Tiempo retención (minutos)		Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza	Uva tinta	Mora	Arándano americano	Zanahoria morada	Opuntia stricta	Colorantes rojos
	Tiempo	Relativo												
Amaranto (E-123)	3,50	0,19												X
Betainina	5,00	0,27											XXX	
Isobetainina	6,80	0,37											X	
Cianidin 3-O-xiloxil-galactósido	7,80	0,42										X		
Delphinidin 3-O-galactósido	8,30	0,45			XXX	X								
Ponceau 4R (E-124)	9,00	0,49												X
Betanidin	9,08	0,49											X	
Delphinidin 3-O-glucósido	10,50	0,57			XXX	X	X		X					
Cianidin 3-O-xiloxil-galactósido	11,20	0,61										XX		
Isobetainidin	11,20	0,61											X	
Cianidin 3-O-sophorósido	11,50	0,63		XXX				X						
Delphinidin 3-O-rutinósido	11,80	0,64					XXX							
Cianidin 3-O-galactósido	12,20	0,66			XX	XXX					XX			
Delphinidin 3-O-arabinósido	12,60	0,68			XX									
Cianidin 3-O-glucosil-rutinósido	12,80	0,70		X				XXX						
Cianidin 3-O-glucósido	14,50	0,79	X	XX	XXX	X	X	X	X	XXX				
Pelargonidin 3-O-sophorósido	15,20	0,83		X										
Cianidin 3-O-xiloxil-galactósido-ferúlico	15,40	0,84										XXX		
Petunidin 3-O-galactósido	15,50	0,84			X									
Cianidin 3-O-rutinósido	16,30	0,89		X			XXX	XX		X				
Cianidin 3-O-arabinósido	16,50	0,90			XX	X					XX			
Cianidin 3-O-xiloxil-galactósido-sinápico	16,90	0,92										XX		
Cianidin 3-O-xiloxil-galactósido-p-Cumárico	17,20	0,93										X		

**Tabla 4.57:** Antocianos, betalainas y colorantes rojos alimentarios identificados.

Compuestos	Tiempo retención (minutos)		Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza	Uva tinta	Mora	Arándano americano	Zanahoria morada	Opuntia stricta	Colorantes rojos
	Tiempo	Relativo												
Petunidin 3-O-glucósido	17,50	0,95			XXX				X					
Pelargonidin 3-O-glucósido	18,40	1,00	XXX	X										
Delphinidin	19,15	1,04					X							
Carmín cochinilla (E-120)	19,30	1,05												X
Peonidin 3-O-galactósido	19,50	1,06			X						XXX			
Petunidin 3-O-arabinósido	19,80	1,08			X									
Pelargonidin 3-O-rutinósido	20,60	1,12	X											
Rojo allura (E-129)	20,80	1,13												X
Rojo 2G (E-128)	21,50	1,17												X
Peonidin 3-O-glucósido	22,00	1,20			X				XXX		X			
Malvidin 3-O-galactósido	22,30	1,21			X									
Cianidin 3-O-xilosido	22,50	1,22								X				
Peonidin 3-O-rutinósido	23,70	1,29						X						
Peonidin 3-O-arabinósido	24,00	1,30									XX			
Cianidin 3-O-(6"-malonyl-glucósido)	24,35	1,32								X				
Malvidin 3-O-glucósido	24,50	1,33			XXX				XXX					
Carmoisina (E-122)	26,20	1,42												X
Malvidin 3-O-arabinósido	26,70	1,45			X									
Malvidin 3-O-(6"-acetyl-glucósido)	27,20	1,48							X					
Cianidin 3-O-(6"-diacetyl-glucósido)	27,70	1,51								X				
Eritrosina (E-127)	28,20	1,53												X
Malvidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucósido)	28,35	1,54							X					

### **- Ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos**

La propuesta de identificación de los ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en las frutas rojas se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, su espectro obtenido en ultravioleta visible y fluorescencia, y por comparación con la bibliografía.

La Tabla 4.58 muestra los 15 ácidos hidroxicinámicos, 7 ácidos hidroxibenzoicos, 4 flavan-3-oles monoméricos y 2 estilbenos identificados en un cromatograma de 30 minutos de duración. Si bien, se ha podido detectar un mayor número de compuestos que todavía faltarían por identificar ya que pertenecen a otros grupos polifenólicos.

El perfil cromatográfico de cada fruta fue diferente aunque no se encontró ningún compuesto específico para una fruta concreta, por lo que se sugiere que no es posible emplear el perfil de ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos o estilbenos como “huella dactilar” de estos zumos de frutas. Sin embargo, podría ser útil para confirmar la presencia de una fruta en concreto como por ejemplo la uva tinta que se caracteriza por contener ácido caftarico y ácido *p*-Cumaroil-tartárico.

Solamente en el caso de la fresa y la frambuesa los compuestos analizados son coincidentes por lo que su perfil no sería determinante como criterio de autenticidad. En el resto de las frutas como mirtilo, arándano europeo, grosella negra, cereza, uva tinta, arándano americano, mora, zanahoria morada o higo chumbo, sus perfiles de composición de ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos son diferentes y pueden ser utilizados como criterio de autenticidad de cada fruta.

El perfil del arándano europeo si es característico y se basa, entre otros componentes, en la presencia de ácido ferúlico y ácido clorogénico. En el supuesto de una mezcla de arándano y mirtilo, el contenido en ácido ferúlico-glucosilado y ácido ferúlico sería de gran interés.

Este método de análisis por HPLC puede aplicarse para los análisis de calidad en los que sea necesario determinar los ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos o estilbenos presentes en los zumos de frutas rojas.

Los resultados de este trabajo sugirieron que puede existir una relación entre los ácidos hidroxicinámicos y los antocianos. Los zumos de fresa y frambuesa contienen ácidos *p*-Cumárico y cafeico, ambos relacionados con la pelargonidina y la cianidin respectivamente. El zumo de mirtilo contiene ácido *p*-Cumárico relacionado con las delphinidinas, petunidinas y malvidinas; los ácidos cafeico y ferúlico están relacionados con las cianidinas y peonidinas. El zumo de arándano europeo contiene presencia de ácidos derivados del *p*-Cumárico relacionados con las delphinidinas y ácidos cafeico y ferúlico relacionados con las cianidinas. El zumo de grosella negra contiene ácido *p*-Cumárico relacionado con las delphinidinas y ácido cafeico relacionado con las cianidinas. Los zumos de cereza y de zanahoria morada contienen sólo ácidos cafeico y ferúlico relacionados a las cianidinas. El zumo de uva tinta contiene ácido *p*-Cumárico relacionado con delphinidina, malvidina y petunidina, y ácido cafeico relacionado con cianidin y peonidina.

Estos resultados podrían indicar dicha relación según las rutas biosintéticas de los principales antocianos (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008), donde el ácido *p*-Cumárico está relacionado con la pelargonidina, delphinidina, petunidina y malvidina en la ruta de la biosíntesis, mientras que el ácido cafeico está en la ruta de las cianidinas y peonidinas. Esta suposición necesita una mayor evaluación con un mayor número de frutas rojas.

**Tabla 4.58:** Ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos identificados en las frutas rojas.

Compuestos	Tiempo retención (minutos)	Grupo polifenólico	Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza	Uva tinta	Mora	Arándano americano	Zanahoria morada	<i>Opuntia stricta</i>
Ácido gálico	3,4	Ác. hidroxibenzoico	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
(-)-Epigallocatequina	3,7	Flavanol monomérico	X						X	X	X		
Ácido cafeico 3-O-tartárico	4,2	Ác. hidroxicinámico							X				X
Ácido neoclorogénico	4,2	Ác. hidroxicinámico						X					
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	4,3	Ác. hidroxibenzoico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
(+)-Catequina	5,9	Flavanol monomérico	X	X	X	X	X	X	X	X			X
Ácido cafeico 4-O-glucósido	6,5	Ác. hidroxicinámico			X	X					X		
Ácido cafeico 4-O-quinico	6,5	Ác. hidroxicinámico					X			X			
Ácido clorogénico	7,6	Ác. hidroxicinámico	X	X	X	X		X	X		X	X	
(-)-Epigallocatequina 3-O-galato	8,0	Flavanol monomérico							X				
Ácido p-Cumárico 3-O-quinico	8,2	Ác. hidroxicinámico					X	X		X			
Ácido p-Cumárico 3-O-glucósido	8,3	Ác. hidroxicinámico	X	X	X						X		
Ácido p-Cumárico 3-O-tartárico	8,3	Ác. hidroxicinámico							X				
Ácido 4-hidroxibenzoico	8,3	Ác. hidroxibenzoico	X	X					X			X	
(-)-Epicatequina	9,2	Flavanol monomérico	X	X	X	X	X	X	X		X		X
Ácido cafeico	10,5	Ác. hidroxicinámico	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Ácido vanílico	11,3	Ác. hidroxibenzoico			X	X		X	X		X		
Ácido siríngico	13,3	Ác. hidroxibenzoico	X	X	X	X	X		X				
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	13,3	Ác. hidroxicinámico				X	X				X		
Ácido p-Cumárico	18,5	Ác. hidroxicinámico	X			X			X			X	
Resveratrol 3-O-glucosa	19,0	Estilbeno			X		X		X				
Ácido elágico 3-O-arabinósido	20,8	Ác. hidroxibenzoico		X									
Ácido elágico	21,1	Ác. hidroxibenzoico	X	X		X	X			X	X		
Resveratrol	22,0	Estilbeno				X			X				
Ácido ferúlico	24,0	Ác. hidroxicinámico			X	X		X			X	X	
Ácido sinápico	26,4	Ác. hidroxicinámico			X	X						X	
Ácido cinámico	27,7	Ác. hidroxicinámico	X			X					X		



#### 4.2.- “Optimización de un método de análisis rápido por UHPLC para polifenoles”

Las condiciones generales del método IFU n° 71, diseñado para el análisis de antocianos, se muestran en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Los estudios recopilados en el apartado anterior 4.1 se han realizado utilizando una columna Zorbax SB-C18 con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, y como fase móvil un gradiente con Agua/Ácido fórmico (90/10) (v/v) como fase A y como fase B: Agua/Acetonitrilo/Ácido fórmico (40/50/10) (v/v/v); la temperatura de análisis fue de 25 °C con un flujo de 1 mL/min; el gradiente de elución se muestra en la Tabla 4.59.

**Tabla 4.59:** Gradiente de elución del método IFU n° 71 para el porcentaje de fase móvil B.

<b>Tiempo</b> (minutos)	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>26</b>	<b>35</b>	38	43	46
<b>% B</b>	<b>6,3</b>	<b>6,3</b>	<b>15,8</b>	<b>52,6</b>	52,6	6,3	6,3

Ante los resultados obtenidos al analizar los antocianos, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en las frutas rojas estudiadas y cuyos resultados se muestran en el apartado 4.1 de la presente Tesis, se plantea ahora mejorar el método de análisis con la finalidad de que sea más rápido, y además pueda detectar un mayor número de grupos de polifenoles tales como flavonas, dihidrochalconas y flavonoles, y así poder abarcar la identificación en un mayor número de frutas que no sean exclusivamente frutas rojas.

Para la mejora de la metodología de análisis se ha utilizado un equipo de UHPLC y se han ensayado distintos sistemas de acidificación, distintas fases móviles, diferentes columnas C18 con distintos tamaños de partícula y dimensiones y, también, se ha estudiado el flujo, la temperatura de análisis y el gradiente de elución.

El motivo de cambiar de equipo de análisis se debe a que en el UHPLC se puede trabajar a mayor presión, reduciendo así el tiempo de análisis y obteniendo una mayor resolución en los cromatogramas.

Para optimizar los análisis se ha empleado el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) como muestra estándar por el elevado número de antocianos que esta fruta posee. La detección e identificación de los mismos se realizó por absorbancia a 520 nm. También

se ensayó el análisis de distintos patrones de polifenoles correspondientes a los siguientes grupos: antocianos (pelargonidina 3-O-glucósido), flavonoles (quercetina 3-O-glucósido), ácidos fenólicos (ácidos gálico y *p*-Cumárico), flavan-3-oles monoméricos ((+)-catequina), flavanonas (hesperidina), dihidrochalconas (floridzina) y estilbenos (resveratrol). Un patrón de vitamina C también se analizó.

#### 4.2.1.- Método UHPLC IFU. Optimización de la columna de análisis.

Se estudiaron tres columnas cromatográficas de fase reversa Zorbax SB-C18 de diferente tamaño de partícula y longitud:

- Columna de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.
- Columna de 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.
- Columna de 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.

La cantidad de muestra inyectada a cada una de ellas se adaptó a las dimensiones de la columna y fue de 10  $\mu\text{L}$  para la columna de 5 micras, 7  $\mu\text{L}$  para la columna de 3,5 micras y 4  $\mu\text{L}$  para la columna de 1,8 micras. Los tiempos de los gradientes se dividieron por 1,5 o 2,5 para las columnas de 3,5 y 1,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Para seleccionar la mejor columna se utilizó una muestra de zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) como muestra estándar, analizando por PDA los antocianos a 520 nm. Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes para cada columna tal y como se muestra en la Figura 4.42 donde se pueden identificar los principales antocianos presentes en el zumo de mirtilo e identificados con números del 1 al 14 (Tabla 4.60). Los tiempos de cromatograma obtenidos con cada columna han sido de 30 minutos para la columna de 5 micras, de 21 minutos para la columna de 3,5 micras y de 12 minutos para la columna de 1,8 micras. La reducción del tiempo de cromatograma va paralela al tamaño de partícula de la columna que permite trabajar a mayor presión reduciendo la longitud de la columna y, por tanto, el tiempo de retención.



**Tabla 4.60:** Identificación de los antocianos presentes en el zumo de mirtilo.

Nº	Identificación de antocianos
1	Dephinidin 3-O-galactósido
2	Delphinidin 3-O-glucósido
3	Cyanidin 3-O-galactósido
4	Delphinidin 3-O-arabinósido
5	Cyanidin 3-O-glucósido
6	Petunidin 3-O-galactósido
7	Cyanidin 3-O-arabinósido
8	Petunidin 3-O-glucósido
9	Peonidin 3-O-galactósido
10	Petunidin 3-O-arabinósido
11	Peonidin 3-O-glucósido
12	Malvidin 3-O-galactósido
13	Malvidin 3-O-glucósido
14	Malvidin 3-O-arabinósido

Para comparar las columnas de análisis en cuanto a la separación de los picos, se estudiaron los parámetros teóricos que afectan a la separación cromatográfica según el comportamiento de los solutos. Los parámetros cromatográficos estudiados están recogidos en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.61.

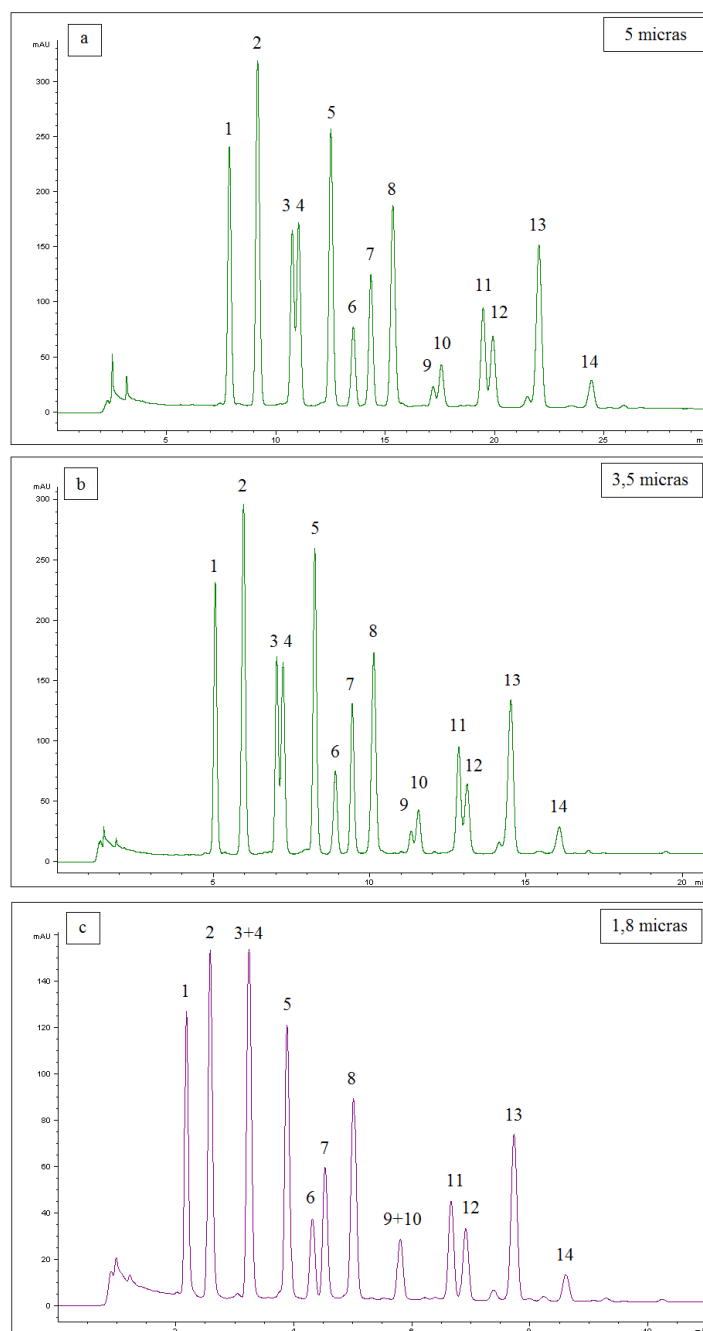
El factor de capacidad ( $k'$ ) es característico de cada pico mientras que el factor de separación ( $\alpha$ ) y la resolución  $R_s$  se establecen entre dos picos consecutivos.

En cuanto al factor de capacidad ( $k'$ ), debe variar entre 1 y 10. Si es menor que 1 el pico no se resuelve bien, si es mayor de 10 el tiempo de cromatograma se hace excesivamente largo (Hernández-Pérez, 2005). La columna de 3,5 micras muestra los valores más altos en este parámetro; por tanto la separación de los picos es la mejor, aunque para el pico número 14 (malvidin 3-O-arabinósido) el valor obtenido es mayor de 10.

El factor de separación o selectividad ( $\alpha$ ) indica la separación relativa entre dos picos consecutivos y debe de ser mayor que 1 (Hernández-Pérez, 2005). Podemos observar en la Tabla 4.61 como las tres columnas estudiadas muestran una selectividad similar lo que indica que se logra una buena separación de los picos. Cabe destacar en la columna de menor tamaño de partícula que el valor obtenido para los picos 3-4 (cianidin 3-O-galactósido y delphinidin 3-O-arabinósido) y 9-10 (peonidin 3-O-galactósido y petunidin 3-O-arabinósido) es de 1, este valor es indicativo de que no existe separación

entre ellos y que se encuentran solapados, tal y como se observa en el cromatograma correspondiente en la Figura 4.42 c.

La resolución ( $R_s$ ) mide el grado de separación existente entre dos picos y debe ser mayor de 1,5 (Hernández-Pérez, 2005). Los valores de resolución más altos obtenidos han sido en la mayoría de los casos con la columna de 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Picos 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 6-7, 8-9 y 10-11).



**Figura 4.42:** Perfil cromatográfico a 520 nm de zumo de mirtilo analizado con diferentes columnas Zorbax SB-C18: a) 5  $\mu\text{m}$  x 250 mm x 4,6 mm; b) 3,5  $\mu\text{m}$  x 150 mm x 4,6 mm; c) 1,8  $\mu\text{m}$  x 100 mm x 4,6 mm.

**Tabla 4.61:** Parámetros cromatográficos obtenidos en el análisis de zumo de mirtilo a 520 nm, con tres columnas Zorbax SB-18 de diferente tamaño de partícula y dimensiones.

Nº pico	Columna	Factor de capacidad (k')	Factor de separación ( $\alpha$ )	Resolución ( $R_s$ )
<b>1</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	2,471	---	---
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	2,786	---	---
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	1,410	---	---
<b>2</b> <b>1↔2</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	3,039	1,230	6,908
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	3,463	1,243	7,129
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	1,856	1,316	4,803
<b>3</b> <b>2↔3</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	3,739	1,230	8,724
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	4,259	1,230	9,491
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	2,588	1,394	7,604
<b>4</b> <b>3↔4</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	3,866	1,034	1,485
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	4,409	1,035	1,564
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	2,588	1,000	0,000
<b>5</b> <b>4↔5</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	4,518	1,169	7,501
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	5,170	1,173	8,253
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	3,304	1,277	7,014
<b>6</b> <b>5↔6</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	4,971	1,100	4,942
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	5,665	1,096	4,783
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	3,778	1,144	4,505
<b>7</b> <b>6↔7</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	5,325	1,071	3,881
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	6,069	1,071	4,264
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	4,017	1,063	2,237
<b>8</b> <b>7↔8</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	5,768	1,083	4,450
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	6,584	1,085	4,407
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	4,551	1,133	4,716
<b>9</b> <b>8↔9</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	6,581	1,141	8,571
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	7,480	1,136	8,992
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	5,426	1,192	7,479
<b>10</b> <b>9↔10</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	6,747	1,025	1,619
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	7,656	1,024	1,517
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	5,426	1,000	0,000
<b>11</b> <b>10↔11</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	7,590	1,125	8,239
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	8,621	1,126	8,519
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	6,381	1,176	8,140
<b>12</b> <b>11↔12</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	7,786	1,026	1,790
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	8,821	1,023	1,581
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	6,655	1,043	2,256
<b>13</b> <b>12↔13</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	8,715	1,119	7,967
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	9,869	1,119	7,262
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	7,564	1,137	6,926
<b>14</b> <b>13↔14</b>	5 $\mu$ 250 x 4,6mm	9,775	1,122	8,751
	3,5 $\mu$ 150 x 4,6mm	11,031	1,118	7,844
	1,8 $\mu$ 100 x 4,6mm	8,538	1,129	7,274

La columna de 1,8 micras permite un tiempo de cromatograma muy corto de 12 minutos y una mejor resolución en los picos 11 (peonidin 3-O-glucósido) y 12 (malvidin 3-O-galactósido) que con el resto de columnas, pero no logra resolver los

picos correspondientes a cianidina 3-O-galactósido y delphinidina 3-O-arabinósido (picos 3 y 4), y peonidina 3-O-galactósido y petunidina 3-O-arabinósido (picos 9 y 10).

En conjunto, el método desarrollado con la columna de 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula muestra la mejor resolución y comparado con el método IFU nº 71 original, ha permitido reducir del orden de 1,5 veces el tiempo necesario de análisis de 30 minutos a 21 minutos, manteniendo la resolución en la separación de los compuestos. No obstante, se puede aconsejar el empleo de la columna de 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula para análisis de zumos con un menor número de antocianos constituyentes que el zumo de mirtilo y que se puedan resolver, ya que este análisis es el más corto (12 minutos) y, por tanto, permite ahorrar más tiempo y disolvente.

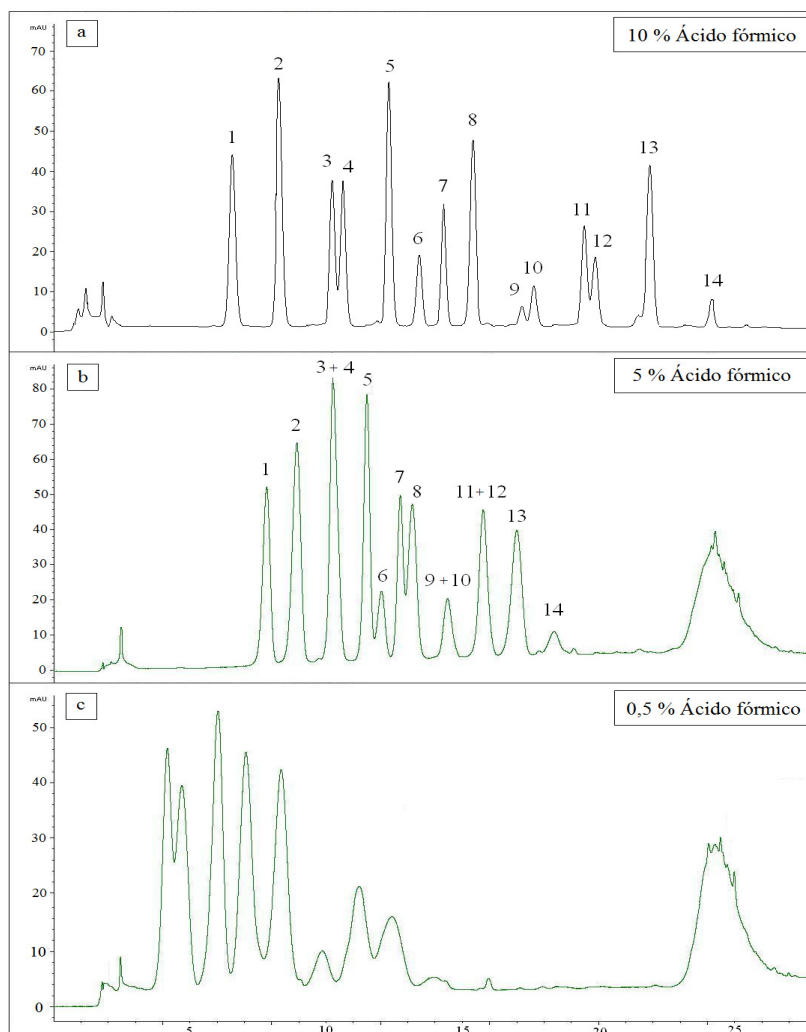
#### **4.2.2.- Nuevo método UHPLC con uso de ácido trifluoracético**

El método IFU nº 71 emplea un 10 % de ácido fórmico en sus fases móviles. Debido a la corrosión que esta alta concentración de ácido provoca en el equipo de análisis, se estudió la disminución de la concentración de éste en la fase móvil y la posible sustitución por otros ácidos como el ácido trifluoroacético, que habitualmente se adiciona a menor concentración.

Los ensayos iniciales se realizaron con una columna cromatográfica de la marca Zorbax SB-C18, con 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno de la casa Agilent (USA), a 25 °C y un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  y un gradiente de elución similar al recogido en la Tabla 4.59. Como muestra estándar se utilizó zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*).

Se ensayaron tres concentraciones distintas de ácido fórmico en las fases móviles A y B: 10 %, 5 % y 0,5 %, respectivamente.

La Figura 4.43 muestra los resultados obtenidos en los análisis de zumo de mirtilo con ácido fórmico. Los compuestos identificados están recogidos en la Tabla 4.60.



**Figura 4.43:** Perfil cromatográfico a 520 nm de zumo de mirtilo con la fase móvil acidificada con ácido fórmico 10 % (a), 5 % (b) y 0,5 % (c).

Al comparar los resultados obtenidos con distintas concentraciones de ácido fórmico en las fases, se observa como los ensayos realizados con 5 % y 10 % muestran los mejores resultados, mientras que con un 0,5 % de ácido fórmico se obtiene muy poca resolución. Este resultado explica la alta concentración de ácido fórmico utilizada en el método IFU n° 71.

Puesto que no es posible bajar la concentración de ácido fórmico, se decidió estudiar la posibilidad de sustituir el uso de ácido fórmico por ácido trifluoracético. Para ello se propuso un nuevo método por UHPLC en el cual se utilizó la columna Zorbax SB-C18 de 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, y ácido trifluoracético al 0,5% como acidificante de la fase móvil. El gradiente de elución se modificó a fin de obtener los mejores resultados de análisis y para poder analizar además de antocianos, otros

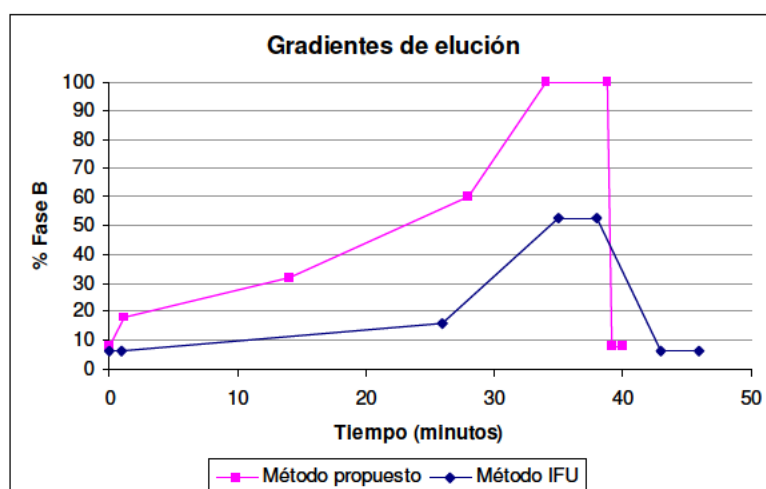
polifenoles que tienen un carácter más hidrofóbico y que se quedan más retenidos en la columna. Así, partiendo del gradiente del método IFU, recogido en la Tabla 4.59, se hicieron algunas modificaciones no solo en la composición sino también en la variación del gradiente con el tiempo. Tras muchas pruebas, el gradiente óptimo encontrado se explica a continuación.

Las fases móviles fueron A: Agua/Ácido trifluoroacético (99,5/0,5) (v/v) y B: Agua/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (49,5/50/0,5) (v/v/v). La Tabla 4.62 muestra el gradiente seleccionado en el nuevo método de análisis.

**Tabla 4.62:** Gradiente de elución del método propuesto para el porcentaje de fase móvil B.

Tiempo (minutos)	0	1,2	14	28	34	38,8	39,2	40
% B	8	18	32	60	100	100	8	8

La Figura 4.44 muestra la comparación de los gradientes de elución entre el método IFU nº 71 y el método propuesto.



**Figura 4.44:** Gráfica comparativa de los gradientes de elución del método IFU nº 71 y el método propuesto.

Las principales diferencias en la variación del gradiente de elución radican en que al inicio del método propuesto el porcentaje de fase B (8 %) es mayor, es decir, se inicia con la fase móvil un poco más hidrofóbica en el primer minuto de análisis y se aumenta dicha cantidad hasta un 18 % en vez de mantenerla constante tal y como establece el método IFU nº 71. La finalidad de esta modificación es aumentar la cantidad de acetonitrilo en la columna para acelerar la salida de los compuestos al inicio del

cromatograma. A partir de ese punto se trata el gradiente de forma paralela al método IFU n° 71 pero se aumenta la cantidad de fase móvil B hasta el 100 % en vez de hasta el 52,6 % como indica el método IFU n° 71 con la finalidad de acelerar la salida de los compuestos que, por ser muy hidrofóbicos, salen más retrasados.

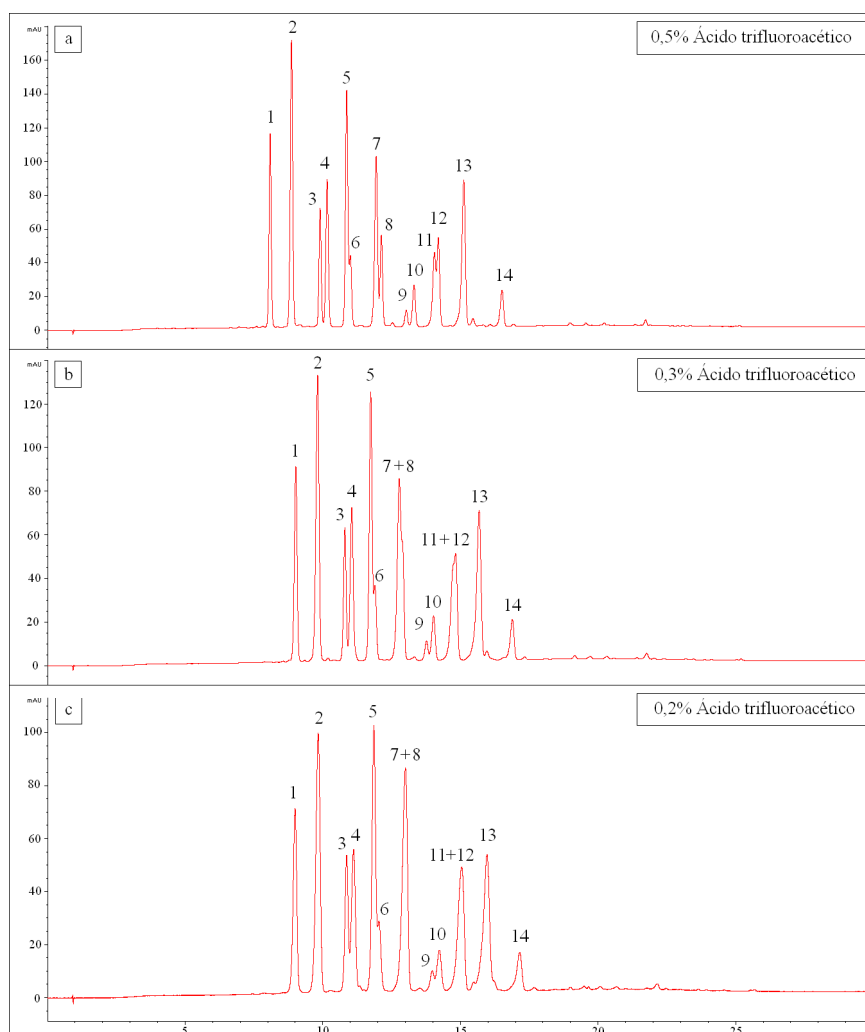
Finalmente, se dejan unos minutos para recuperar las condiciones iniciales, por ese motivo, aunque el tiempo final de cromatograma en el que identificamos los compuestos es de 30 minutos, el análisis completo tiene una mayor duración para realizar la limpieza de la columna de análisis y volver a estabilizarla a las condiciones de inicio.

Los estudios se realizaron termostalizando la columna a 25 °C. Para optimizar la temperatura de análisis se analizó nuevamente el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), ensayando el análisis a 20, 25, 30, 35 y 40 °C, utilizando la columna de 1,8 micras de tamaño de partícula y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, y la fase móvil acidificada con 0,5 % de ácido trifluoroacético.

Se observó que a temperaturas más elevadas se resuelven mejor los picos más retrasados en el cromatograma, mientras que a temperaturas más bajas la resolución fue mejor en los compuestos con menor tiempo de retención. Además, conforme disminuyó la temperatura, el cromatograma se fue retrasando, pasando de obtener el primer pico a un tiempo de 5,7 minutos a 40 °C frente a los 8,4 minutos del cromatograma a 20 °C. Así, se tomó un valor de temperatura de análisis intermedio de 25 °C como óptima, debido a que permitía una buena resolución tanto al principio como al final del cromatograma.

Con objeto de optimizar la concentración de ácido trifluoroacético y ver si era posible trabajar con concentraciones menores, se ensayaron valores de: 0,2 %, 0,3 % y 0,5 % respectivamente.

En cuanto a los resultados obtenidos variando la concentración de ácido trifluoroacético (Figura 4.45), se puede observar que las tres concentraciones seleccionadas muestran cromatogramas con buena resolución, si bien, la concentración con 0,5 % de ácido trifluoroacético es la más idónea ya que logra separar los 14 picos correspondientes a los antocianos del mirtilo, mientras que a concentraciones de 0,3 % y 0,2 % algunos de los picos se solapan y no se resuelven bien.



**Figura 4.45:** Perfil cromatográfico a 520 nm de zumo de mirtilo con la fase móvil acidificada con ácido trifluoroacético 0,5 % (a), 0,3 % (b) y 0,2 % (c).

Una vez seleccionada la columna, la fase móvil, el gradiente y la temperatura, se procedió a optimizar el flujo. Para ello se utilizó nuevamente el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) como muestra estándar. El flujo se ensayó a 0,5 / 1 / 1,5 / 2 y 2,5 mL/min y se observó que al disminuir el flujo de análisis, el cromatograma se iba retrasando, como es habitual, llegando a existir una diferencia de 6 minutos entre el cromatograma analizado a 2,5 mL/min y el de 0,5 mL/min. En cuanto a la resolución obtenida, la mejor separación de los picos correspondientes a los antocianos del mirtilo, se obtuvo en los flujos de 1 y 0,5 mL/min, de estas velocidades, se seleccionó el flujo de 1 mL/min para evitar que el cromatograma se alargue en exceso.

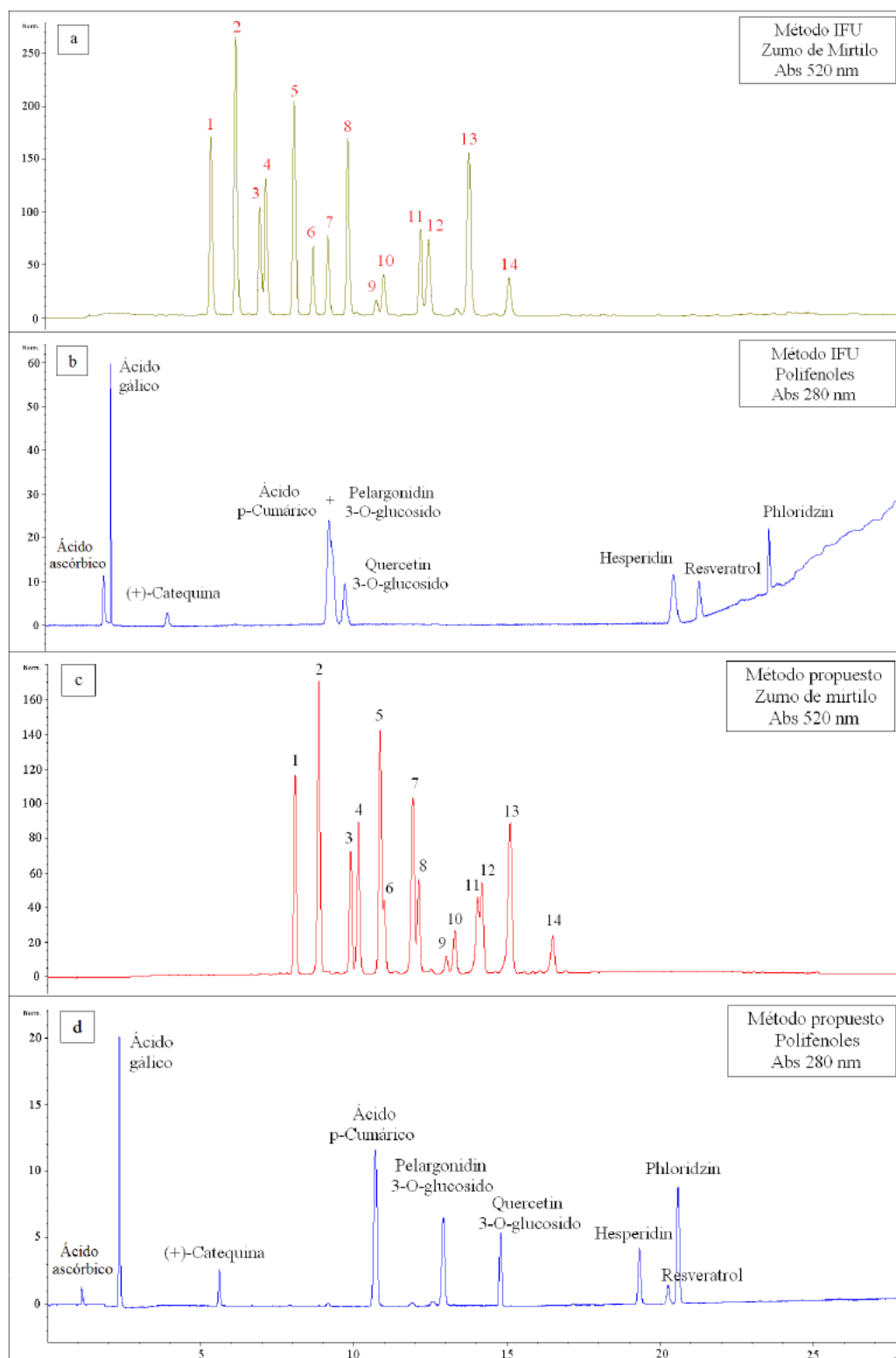


En resumen, el nuevo método propuesto utiliza una columna Zorbax SB-C18 de 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 100 x 4,6 mm. La fase móvil acidificada con ácido trifluoroacético al 0,5 %, 25 °C de temperatura y 1 mL/min de flujo. El gradiente de elución recogido en la Tabla 4.62 favorece la salida de los compuestos más hidrofóbicos. Además, este ácido menos corrosivo con el equipo y, presenta a tiempos prolongados de cromatograma una mayor estabilidad en la línea base que el ácido fórmico al 10 %.

#### 4.2.3.- Comparación del método UHPLC IFU nº 71 con el método propuesto

Para realizar la comparación de los dos métodos se analizó el zumo de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) y una mezcla de patrones de los grupos de polifenoles más representativos presentes en los zumos de frutas. Así se analizaron los ácidos fenólicos: gálico y *p*-Cumárico, y los flavonoides: pelargonidina 3-O-glucósido, resveratrol, (+)-catequina, hesperidina, quercetina 3-O-glucósido y floridzina. Los patrones se prepararon todos juntos a una concentración final de 0,1 mg/mL, y a la mezcla se añadió ácido ascórbico a 0,4 mg/mL. El motivo principal de incluir en el grupo de patrones el ácido ascórbico se debe a su presencia en las frutas en altas concentraciones y a que da positivo en los análisis con el método de Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales. Este método se emplea en ensayos posteriores en el presente trabajo.

En la Figura 4.46 se presenta el perfil de los antocianos del zumo de mirtilo a 520 nm y el perfil del conjunto de ácidos fenólicos y flavonoides escogidos como patrones representativos de otros polifenoles y detectados a 280 nm.



**Figura 4.46:** Perfiles cromatográficos de zumo de mirtilo analizados por el método IFU nº 71 a 520 nm (a) y 280 nm (b); y por el método propuesto también a 520 nm (c) y 280 nm (d).

En los cromatogramas a 520 nm se puede observar como el método propuesto permite separar e identificar 14 antocianos del mirtilo (Figura 4.46 c), al igual que el método IFU n° 71 (Figura 4.46 a). Éste último muestra mayor resolución para los antocianos. Por tanto este será el método de elección, si solamente se quieren estudiar los perfiles de antocianos.

Sin embargo, si atendemos al análisis de otros polifenoles detectados a 280 nm se puede observar que en el cromatograma obtenido con el método UHPLC IFU n° 71 para el caso de la mezcla de patrones (Figura 4.46 b), algunos de los compuestos aparecen juntos en un mismo pico, como es el caso del ácido *p*-Cumárico y la pelargonidina 3-O-glucósido, la línea base se eleva a concentraciones altas de acetonitrilo impidiendo la correcta integración de los últimos picos. En el método propuesto se obtiene una mejor línea base y, los compuestos eluyen antes (Figura 4.46 d). Además, al trabajar con una fase móvil de menor concentración de ácido, se protege al equipo ante problemas de corrosión, y es posible obtener mejores señales en los espectros a longitudes de onda más bajas.



### **4.3.- “Determinación del perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de frutas por UHPLC-PDA-FLUORESCENCIA”**

Una vez optimizado el método de análisis por UHPLC se procedió a analizar nuevamente las frutas rojas estudiadas y también la naranja, la manzana y el plátano por ser componentes de los zumos más consumidos.

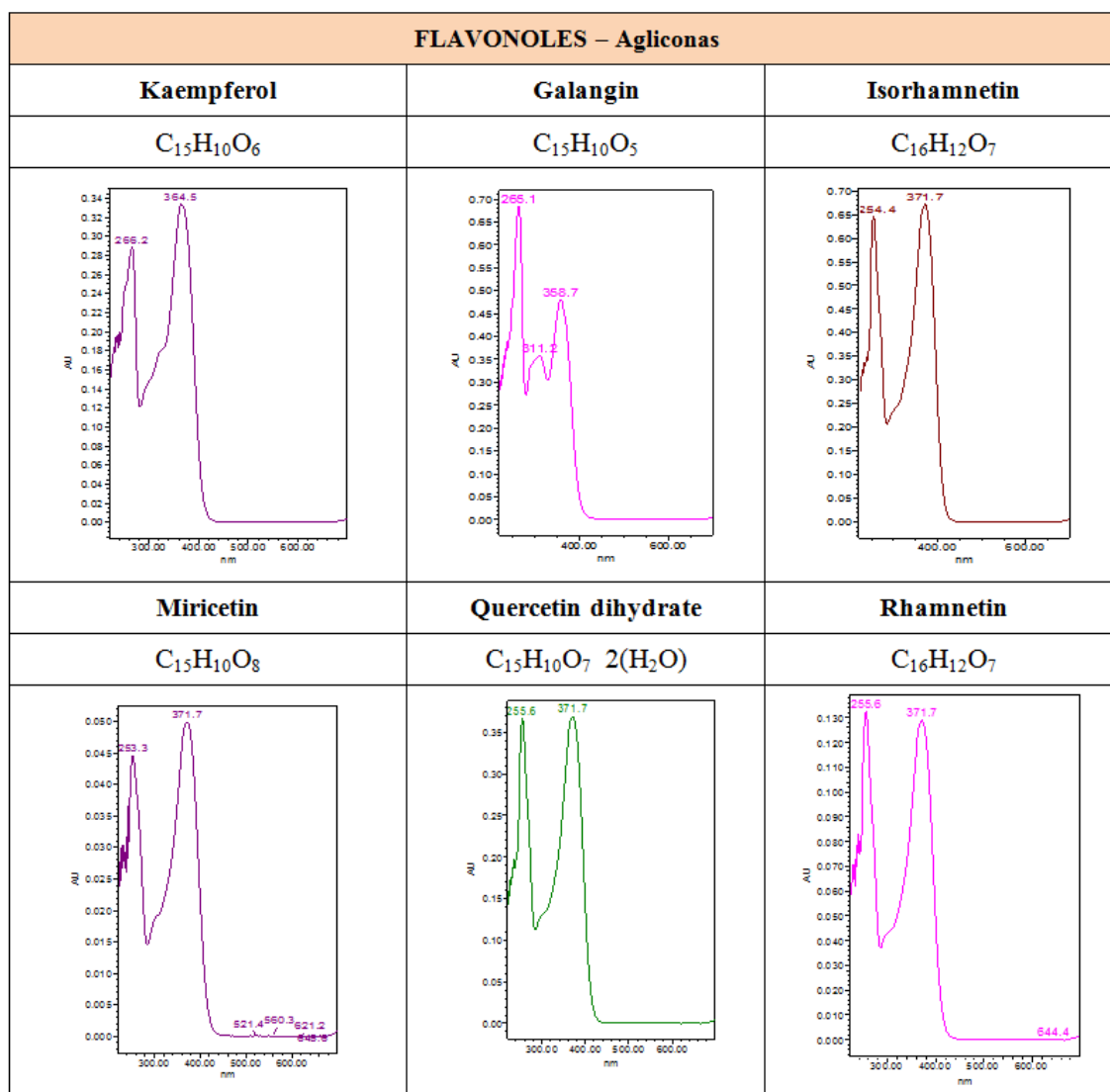
Para complementar el análisis de polifenoles estudiados en el apartado 4.1, se van a estudiar los flavonoles, las flavanonas y las dihidrochalconas. Se abarca así en conjunto los principales compuestos polifenólicos presentes en las frutas. Además, se analiza el contenido en vitamina C en cada una de las muestras de fruta estudiadas.

Los diferentes polifenoles se identifican según su orden de elución y comparando el tiempo de retención de los patrones puros, las características de los espectros en UV-Visible y/o fluorescencia, y contrastando con la bibliografía.

Dentro de cada grupo de polifenoles se seleccionaron como patrones: kaempferol, galangin, isorhamnetin, miricetin, quercetin dihidrato, rhamnetin, cinarin, quercetin 3-O-glucósido, quercetin 3-O-rutinósido, quercetin 3-O-galactósido, quercetin 3-O-rhamnósido, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-rutinósido e isorhamnetin 3-O-rutinósido como flavonoles; hesperidin 7-rutinósido, didymin, narirutin y naringin como flavanonas; y floridzin como dihidrochalcona. Se estudiaron sus espectros de absorbancia en UV-Visible y sus espectros de fluorescencia para fijar las condiciones de detección en el análisis por UHPLC.

#### **4.3.1.- Optimización de las condiciones de detección**

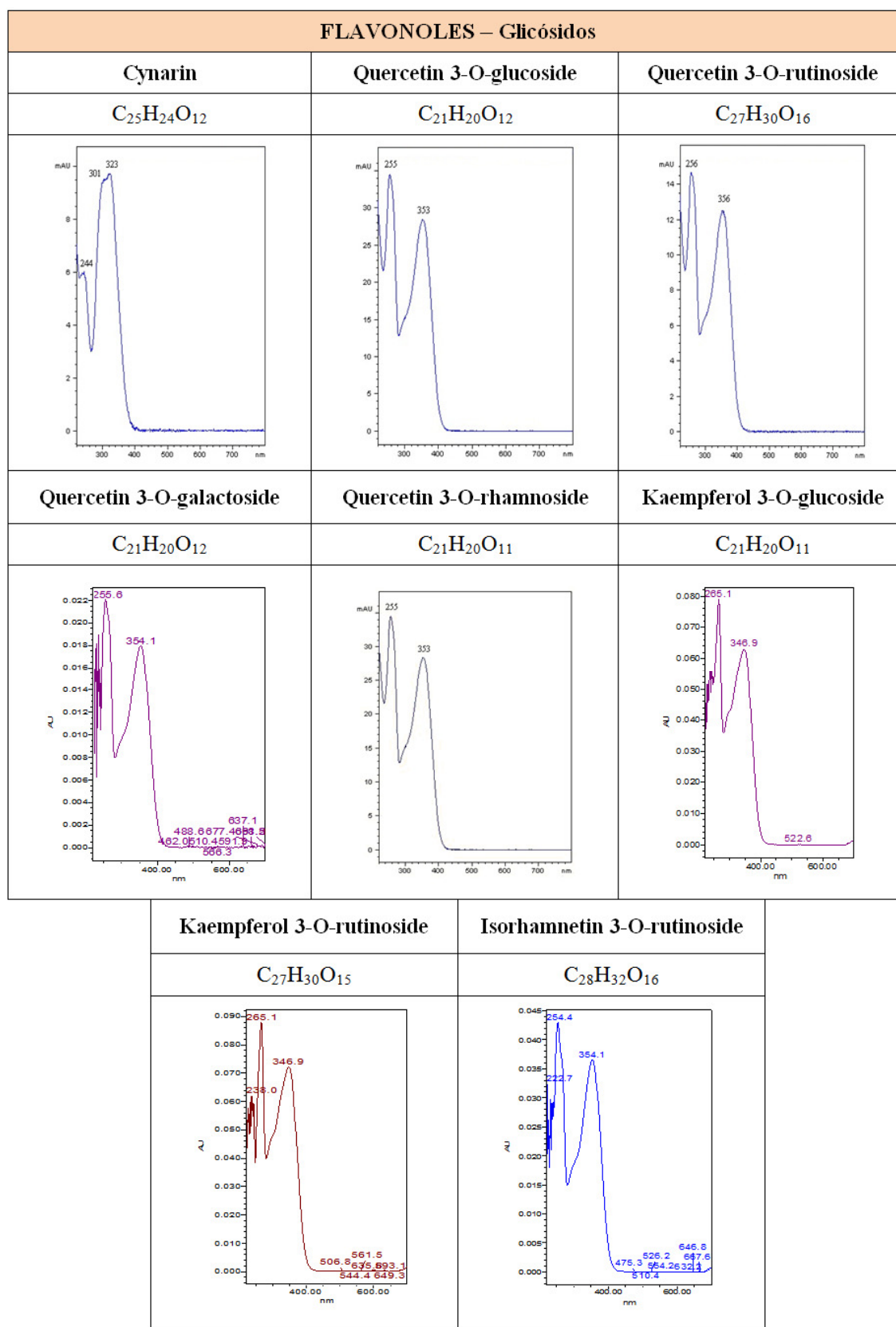
Al igual que se ha hecho en el apartado 4.1 para la determinación de antocianos, betalaínas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos, en este caso para estudiar los flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas, se comienza por estudiar los espectros de absorbancia y fluorescencia de algunos compuestos seleccionados como patrones. Así, los espectros de absorbancia en UV-Visible de los patrones individuales de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas estudiados, se muestran en las Figuras 4.47, 4.48 y 4.49.



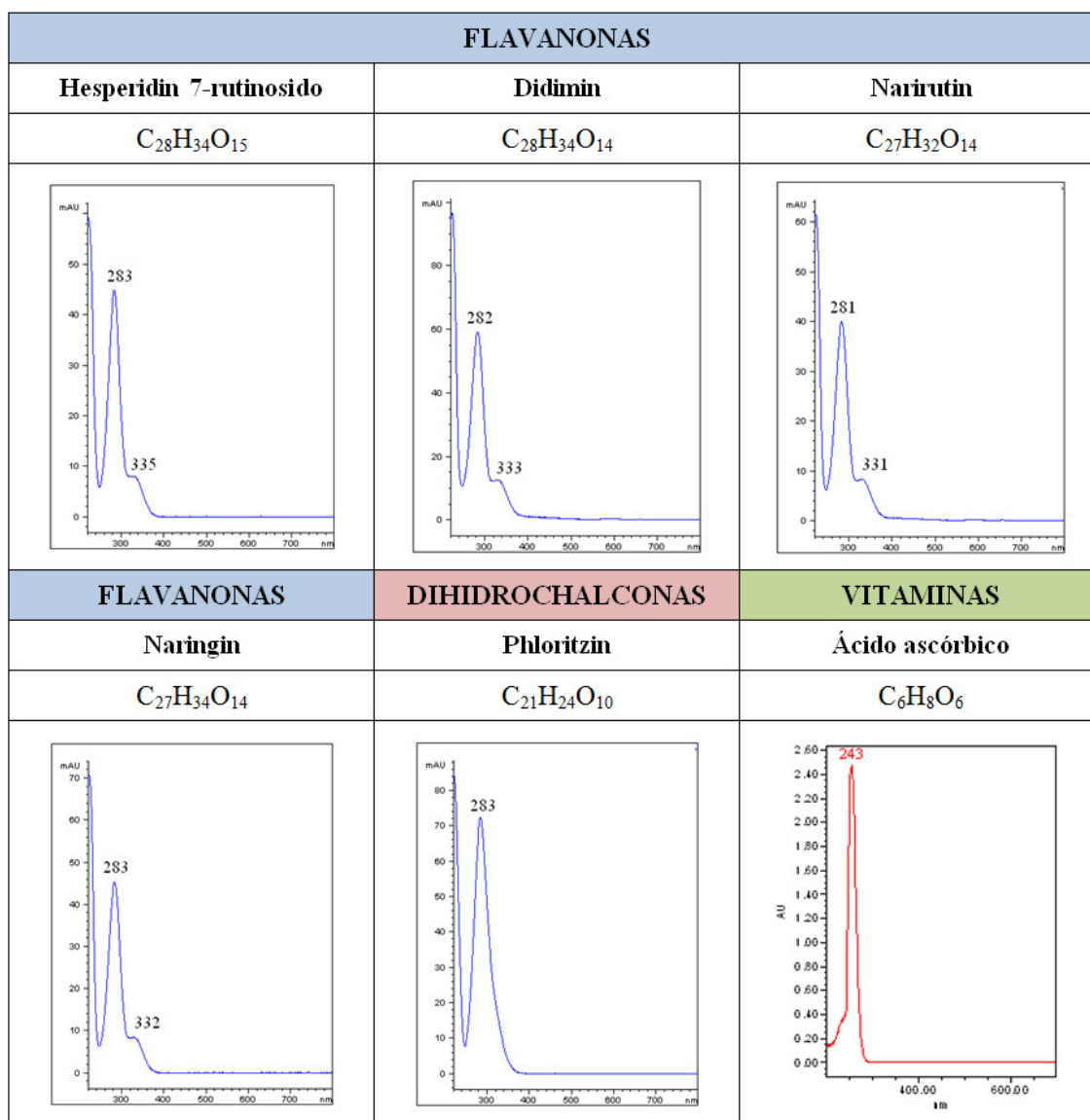
**Figura 4.47:** Espectros individuales de absorbancia y fórmula química condensada de los flavonoles (agliconas).

Como era de esperar por su estructura química todos los compuestos estudiados absorben en ultravioleta y poseen dos máximos de absorbancia, uno en torno a los 250 nm y el otro en la barrera del UV y el visible entre 358 y 371 nm.

Se estudiaron los patrones de flavonoles tanto de sus agliconas (Figura 4.47) como de sus glicósidos (Figura 4.48).



**Figura 4.48:** Espectros individuales de absorbancia y fórmula química condensada de los flavonoles (glicosidos).



**Figura 4.49:** Espectros individuales de absorbancia y fórmula química condensada de las flavanonas, dihidrochalconas y estilbenos.

En la Figura 4.49 se representan los espectros de absorbancia de las flavanonas, las dihidrochalconas y la vitamina C que se han estudiado como patrones en este apartado. Estos grupos de polifenoles poseen un máximo de absorbancia en torno a los 280 nm, excepto la vitamina C cuyo máximo se encuentra a 243 nm.

Los espectros de absorbancia de estos patrones se utilizarán en la identificación posterior de los polifenoles presentes en los zumos analizados.



Aunque no hay datos bibliográficos sobre la fluorescencia de los grupos de polifenoles correspondientes a flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas se analizaron también sus espectros de fluorescencia tal y como se explica en el Capítulo 3 de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos mostraron que este grupo de polifenoles no posee fluorescencia significativa a excepción de los patrones de flavonoles cinarin, quercetin 3-O-glucósido, rhamnetin y miricetin. Pero en conjunto no son compuestos que se detecten mejor por fluorescencia, de modo que el estudio se ha realizado con detección solo por PDA.

La Tabla 4.63 muestra el resumen de las características espectrofotométricas obtenidas para los polifenoles estudiados en este apartado.

**Tabla 4.63:** Características espectrofotométricas de los flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas y de la vitamina C.

<b>Polifenoles</b>	<b>Absorbancia (<math>\lambda_{\text{máx}}</math>) (nm)</b>
<b>FLAVONOLES</b>	
Kaempferol	266 y 364
Galangin	265, 311 y 358
Isorhamnetin	254 y 371
Miricetin	253 y 371
Quercetin dihydrate	255 y 371
Rhamnetin	255 y 371
Cynarin	244, 301 y 323
Quercetin 3-O-glucósido	255 y 353
Quercetin 3-O-rutinósido	256 y 356
Quercetin 3-O-galactósido	255 y 354
Kaempferol 3-O-glucósido	265 y 347
Kaempferol 3-O-rutinósido	265 y 347
Isorhamnetin 3-O-rutinósido	254 y 354
<b>FLAVANONAS</b>	
Hesperidin 7-rutinósido	283 y 335
Didimin	282 y 333
Narirutin	281 y 331
Naringin	283 y 332
<b>DIHIDROCHALCONAS</b>	
Floridzin	283
<b>VITAMINAS</b>	
Ácido ascórbico	243

#### **4.3.2.- Identificación de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas en zumos de fruta determinados por el método de UHPLC-PDA-Fluorescencia**

Doce zumos de frutas, de los mayormente consumidos, se seleccionaron para determinar la composición de los flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas. Los nueve zumos de frutas rojas (fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo y americano, cereza, grosella negra, mora y uva tinta) estudiados en el apartado anterior, y otros tres zumos de fruta: naranja, manzana y plátano de los habitualmente consumidos. La razón de esta selección de frutas se debe a que las frutas rojas son una importante fuente de antocianos; la fresa, frambuesa, cereza y arándano son una fuente rica de flavonoles y flavan-3-oles monoméricos; la uva tinta se caracteriza por ser una rica fuente de estilbenos; la naranja es una fuente rica de flavanonas y la manzana es la fuente principal de dihidrochalconas.

Todos los zumos de frutas se determinaron con el método propuesto por UHPLC-PDA-Fluorescencia y también por HPLC-MS. Las condiciones de análisis están recogidas en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran por grupos de polifenoles y se identifican en diferentes cromatogramas según la longitud de onda característica de los compuestos estudiados. La longitud de onda para determinar los flavonoles es 360 nm y, para determinar las flavanonas y dihidrochalconas, es de 280 nm. Cabe destacar que las flavanonas solo están presentes en los cítricos, por lo que identificaremos su presencia en la naranja; y las dihidrochalconas son características de la manzana, por lo que este grupo lo identificaremos en esta fruta solamente. Como son muchos los polifenoles presentes en las frutas, sólo se identificaron los mayoritarios, así, no se tuvieron en cuenta los picos con áreas menores del 2 %.

Al comparar nuestros resultados con los descritos por otros autores encontramos que el tratamiento de la muestra previo al análisis puede ser diferente. Así, en general, cuando se describe la presencia sólo de agliconas, como por ejemplo kaempferol, quercetin o miricetin, es porque la muestra se ha sometido a una hidrólisis previa. En nuestro caso los análisis se han hecho directamente del zumo sin hidrólisis previa. Aun así, las discrepancias que pueden existir entre los diversos autores se deben a las frutas de estudio, su variedad, grado de maduración, estado de conservación, etc.

Además, para ayudarnos en la identificación de los compuestos más dudosos presentes en las frutas, éstas se analizaron por HPLC-MS. En la Tabla 4.64 se muestran las fragmentaciones de los polifenoles estudiados y que nos ha servido para la identificación de los compuestos.

**Tabla 4.64:** Fragmentaciones de los compuestos polifenólicos estudiados para su determinación por HPLC-MS.

	Compuesto	[M-H] <sup>+</sup>	Pico base	MSn (m/z)
<b>Antocianos</b>	Cianidin 3-arabinósido	419.25	419.25	287.22
	Cianidin 3-galactósido	449.23	449.23	287.13
	Cianidin 3-glucósido	449.23	449.23	287.13
	Cianidin 3-rutinósido	595.36	595.36	287.10
	Cianidin 3-glucosil-rutinósido	757.41	757.41	611.38 - 287.27
	Cianidin-3-sophorósido	647.19	647.19	287.10
	Delfinidina 3-arabinósido	435.21	435.21	303.16
	Dephinidin 3-galactósido	465.26	465.26	303.16
	Delfinidina 3-glucósido	465.26	465.26	303.16
	Malvidina 3-arabinósido	453.33	453.33	331.15
	Malvidina 3-galactósido	493.24	493.24	331.22
	Malvidina 3-glucósido	493.31	493.31	331.22
	Malvidina 3-O-(6"-acetil-glucósido)	535.33	535.33	331.13
	Malvidina 3-O-(6"-p-cumaroil-glucósido)	638.97	638.97	331.03
	* Pelargonidina 3-glucósido	433.02	433.02	271.10
	Pelargonidina 3-rutinósido	579.17	579.17	270.1
	Peonidina 3-arabinósido	433.10	433.10	300.90
	Peonidina 3-galactósido	463.26	463.26	301.23
	Peonidina 3-glucósido	463.26	463.26	301.16
	Petunidina 3-arabinósido	449.23	449.23	317.19
	Petunidina 3-galactósido	479.28	479.28	317.12
	Petunidina 3-glucósido	479.22	479.22	317.19
<b>Flavonoles</b>	* Miricetina	319.18	319.18	481.22
	Miricetina-3-rutinósido	627.40	319.25	
	Miricetina arabinósido	451.01	319.18	
	Miricetina 3 glucósido	481.00	319.18	
	Quercetina	303.09	303.09	
	Quercetina-3-O-galactósido	465.26	303.16	
	Quercetina-3-glucurónido	479.22	303.16	
	Quercetina-3-O-rhamnósido	449.43	303.16	
	* Quercetina-3-b-D-glucósido	465.32	303.09	
	Quercetina-3-glucosil-rutinósido	773.30	303.23	
	* Quercetina-3-O-rutinósido	465.32	303.16	479.15
	Quercetina arabinósido	435.11	303.00	
	Isorhamnetina-3-O-rutinósido	625.00	317.19	
	Isorhamnetina-7-O-rutinósido	625.00	317.19	
	* Kaempferol	287.10	287.10	
	* Kaempferol-3-O-glucósido	449.23	287.13	196.77
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>	* Ácido gálico	170.88	129.9	118.96
	* Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	154.94	141.96	
	* Ácido elágico	303.21	303.21	
	* Ácido siríngico	199.17	139.8	122.7-154.8
	* Ácido vanílico	168.90		
	Ácido 4-hidroxibenzoico-4-glucósido	318.97	300.92	
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>	* Ácido clorogénico	354.93	162.93	206.91-141.92
	* Ácido cafeico	180.91	180.91	
	* Ácido p-Cumárico	165.00	146.85	
	* Ácido sinápico	224.84	224.84	130.77-79.94
	* Ácido cinámico	148.86	148.86	
	* Ácido ferúlico	194.76	177.01	294.08
	Ácido neoclorogénico	354.86	163.11	
	Ácido p-Cumaroil quínico	338.87	146.88	
	Ácido p-Cumaroil tartárico	297.23	147.05	
	* Ácido cafeoil-tartárico	312.05	163.03	
	Ácido ferúlico-4-glucósido	356.85	194.76	
<b>Flavanonas</b>	* Narirutina	581.18	273.06	435.06
	* Naringina	581.33	272.84	435.31
	* Hesperidina	611.24	611.24	390.86
	Hesperitina-7-rutinósido	611.31	303.23	449.23
	* Didimin	596.38	596.38	196.12
<b>Dihidrochalconas</b>	* Floridzina	275.17	275.17	199.52-158.06
<b>Flavan-3-ols</b>	* (+) Catequina	290.93	138.89	165.19-146.98-123.25
	* (-)-Epigallocatequina	307.22	307.22	197.23
	* (-)-Epigallocatequina 3-galato	459.02	459.02	288.95
	* (-)-Epicatequina	290.89	138.85	165.19-146.98-123.25
<b>Estilbenos</b>	* Resveratrol	228.91	228.91	
	Resveratrol glucósido	228.82	228.82	

(\*) Compuestos puros

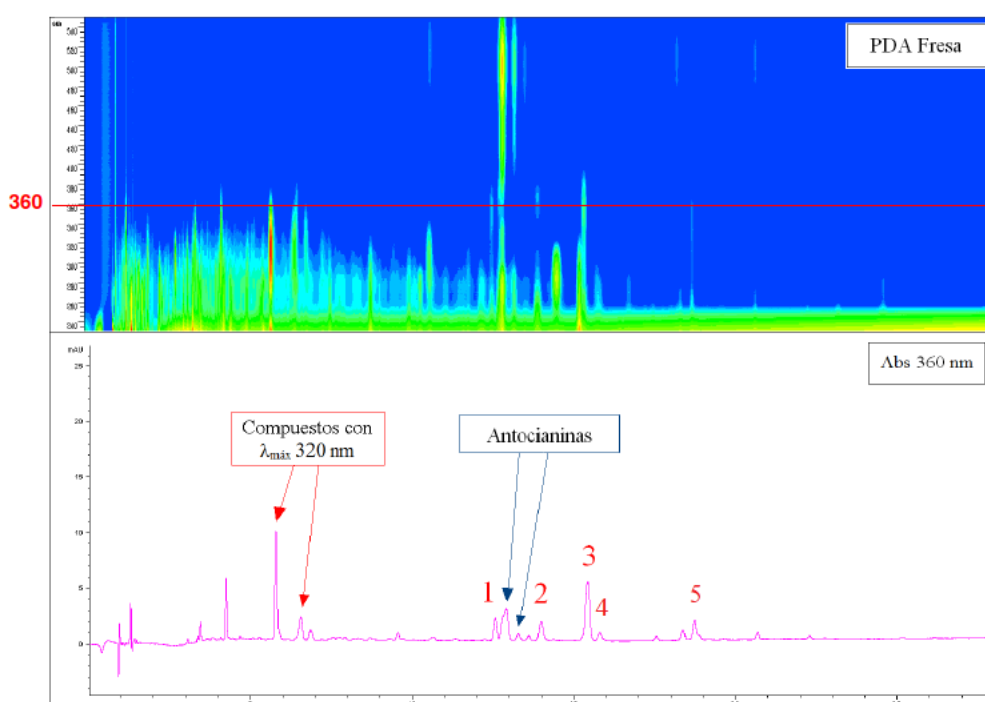
## FRUTAS ROJAS

### 4.3.2.1.- FRESA (Strawberry; *Fragaria x ananassa*)

La muestra de fresa analizada ha sido un puré de 6,8 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

#### ➤ Flavonoles presentes en la fresa

El cromatograma general de la fresa obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.50.



**Figura 4.50:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la fresa.

En la Figura 4.50 podemos observar como el perfil obtenido a 360 nm muestra una buena separación de los picos. Si bien, los picos correspondientes a los antocianos y a compuestos de otras longitudes de onda distinta a la estudiada se indican para no crear confusión. Los flavan-3-oles aparecen marcados con números del 1 al 5 y su identificación se recoge en la Tabla 4.65. Para la identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto, además de las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.66.

**Tabla 4.65:** Detección e identificación de los flavonoles de la fresa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (mAU)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	12,6	2	253 y 370	Miricetin 3-O-rutinósido
2	14,1	2	256 y 356	Quercetin 3-O-rutinósido
3	15,5	5	255 y 354	Quercetin 3-O-glucurónido
4	15,9	2	255 y 353	Quercetin 3-O-glucósido
5	18,6	2	265 y 347	Kaempferol 3-O-glucósido

Los compuestos identificados quercetin 3-O-glucósido, quercetin 3-O-glucurónido y kaempferol 3-O-glucósido coinciden con la determinación de Zheng (2007) que indica su presencia en 8,8  $\mu\text{g/g}$ , 1,2  $\mu\text{g/g}$  y 1,7  $\mu\text{g/g}$  respectivamente, y también con la determinación de Gil *et al.* (1997). Además, identificamos la presencia de miricetin 3-O-rutinósido coincidiendo Häkkinen (1999) que, tras hidrolizar la muestra, establece la presencia de miricetin en un 1,6 %. También, se detecta quercetin 3-O-rutinósido que no ha sido previamente descrito, pero sí su aglicona por Aaby *et al.* (2012), Häkkinen *et al.* (1999) y la base de datos USDA.

**Tabla 4.66:** Flavonoles presentes en la fresa según la bibliografía.

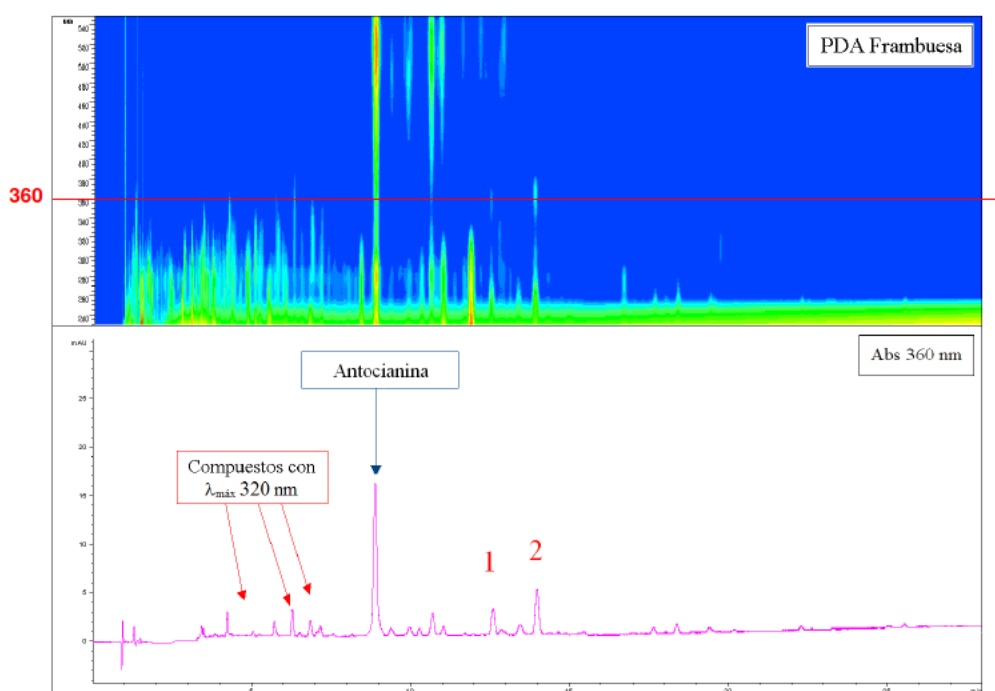
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Aaby <i>et al.</i> , 2012	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007	Zheng <i>et al.</i> , 2007 ( $\mu\text{g/g}$ )	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)	Gil <i>et al.</i> , 1997
Kaempferol	--	0,46	X	--	--	3,1	--
<u>Kaempferol 3-O-glucósido</u>	0,32	--	--	--	1,7	--	X
Kaempferol 3-O-glucurónido	0,20	--	--	--	--	--	--
Quercetin	--	1,14	X	--	--	6	--
<u>Quercetin 3-O-glucósido</u>	--	--	--	X	8,8	--	X
<u>Quercetin 3-O-glucurónido</u>	1,74	--	--	--	1,2	--	X
Miricetin	--	--	--	--	--	1,6	--

#### 4.3.2.2.- FRAMBUESA (Raspberry; *Rubus idaeus* L.)

La muestra de frambuesa analizada fué un puré con 7,2 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Flavonoles presentes en la frambuesa

El cromatograma general de la frambuesa obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.51.



**Figura 4.51:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la frambuesa.

Se detectan dos flavan-3-oles marcados con los números 1 y 2, en la Tabla 4.67 se muestra su tiempo de retención y su longitud de onda máxima. Para la identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto. Estos resultados se compararon con los descritos en las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.68.

**Tabla 4.67:** Detección e identificación de los flavonoles de la frambuesa.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	12,5	2	253 y 370	Miricetin 3-O-rutinósido
2	14,1	4	256 y 356	Quercetin 3-O-rutinósido

En el presente trabajo se identificaron solo dos compuestos: quercetin 3-O-rutinósido detectado también por Jacobek *et al.* (2009) y descrito en la base de datos de Phenol-Explorer, y un segundo compuesto miricetin 3-O-rutinósido del que Häkkinen *et al.* (1999) describe la presencia del aglicón. Aunque Phenol-Explorer y Jakobek *et al.* (2009) describen un mayor número de compuestos, en la muestra de frambuesa analizada no se han detectado.

**Tabla 4.68:** Flavonoles presentes en la frambuesa según la bibliografía

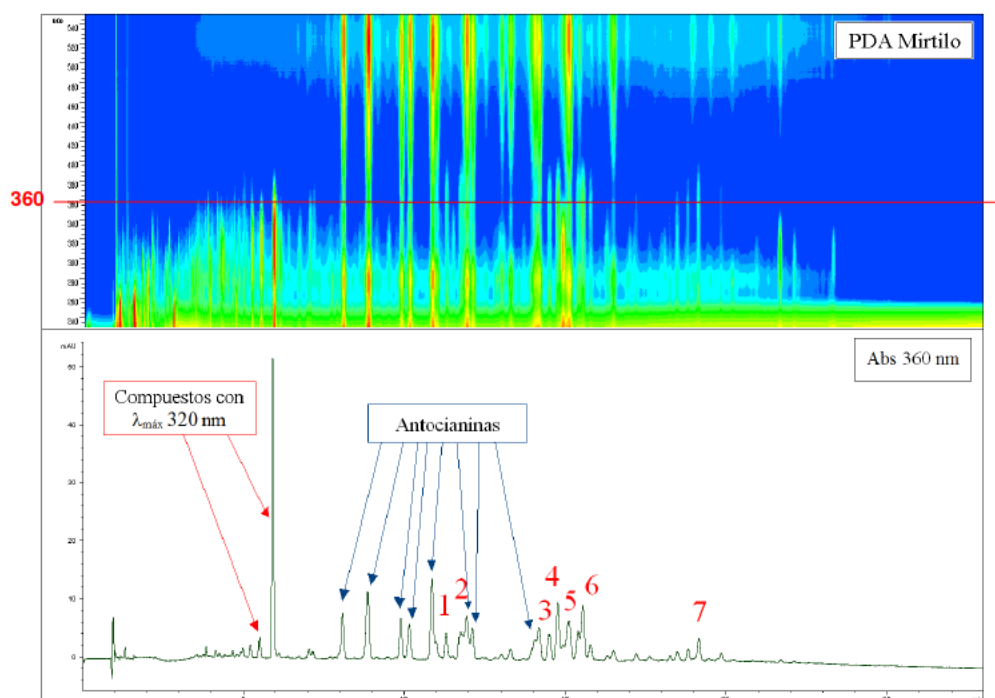
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Jakobek <i>et al.</i> 2009	Wang <i>et al.</i> , 2009 (µg/g)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
Kaempferol	$2,6 \cdot 10^{-3}$	0,09	--	--	--	0,2
Kaempferol 3-O-glucósido	1,03	--	--	--	--	--
Kaempferol 3-O-glucurónido	--	--	--	5,6	--	--
Quercetin	0,02	1,23	--	--	--	1,7
Quercetin 3-O-glucósido	3,58	--	X	--	1,6	--
Quercetin 3-O-glucurónido	0,63	--	X	25,3	--	--
<u>Quercetin 3-O-rutinósido</u>	11,0	--	X	--	--	--
Quercetin 3,4-diglucósido	--	--	X	--	--	--
Miricetin	--	--	--	--	--	0,7

#### 4.3.2.3.- MIRTILO (Blueberry; *Vaccinium myrtillus* L. wild)

La muestra de mirtilo analizada ha sido un zumo de 12,9 °Brix procedente de la casa comercial Grünewald (Austria).

##### ➤ Flavonoles presentes en el mirtilo

El cromatograma general del mirtilo obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.52.



**Figura 4.52:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm del mirtilo.

Los flavonoles indicados con los números del 1 al 7 están recogidos en la Tabla 4.69 donde se muestran los tiempos de retención y valores de longitud de onda máxima. La identificación se hizo en base al tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto, además se contrastó con las referencias bibliográficas consultadas que están resumidas en la Tabla 4.70.

El mirtilo posee un elevado número de antocianinas que se detectan por absorbancia a 360 nm y que están indicadas en la Figura 4.52.



**Tabla 4.69:** Detección e identificación de los flavonoles del mirtilo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	11,3	5	--	n.i.
2	11,7	8	253 y 369	Miricetin 3-O-arabinósido
3	14,6	5	256 y 355	Quercetin 3-O-arabinósido
4	14,8	10	255 y 354	Quercetin 3-O-galactósido
5	15,2	9	--	n.i.
6	15,7	10	255 y 354	Quercetin 3-O-glucurónido
7	19,2	5	265 y 346	Kaempferol 3-O-rutinósido

n.i. (No identificado)

Se estableció también la presencia de dos compuestos con una longitud de onda máxima de 320 nm y de siete flavonoles. De éstos se han identificado cinco, los que quedan sin identificar podrían ser quercetin 3-O-acetil-rhamnósido y quercetin 3-O-xilosido que están descritos en la base de datos de Phenol-Explorer a una alta concentración.

En los estudios de otros autores el número de flavonoles descrito en el mirtilo es más reducido, que los encontramos en este estudio.

**Tabla 4.70:** Flavonoles presentes en el mirtilo según la bibliografía

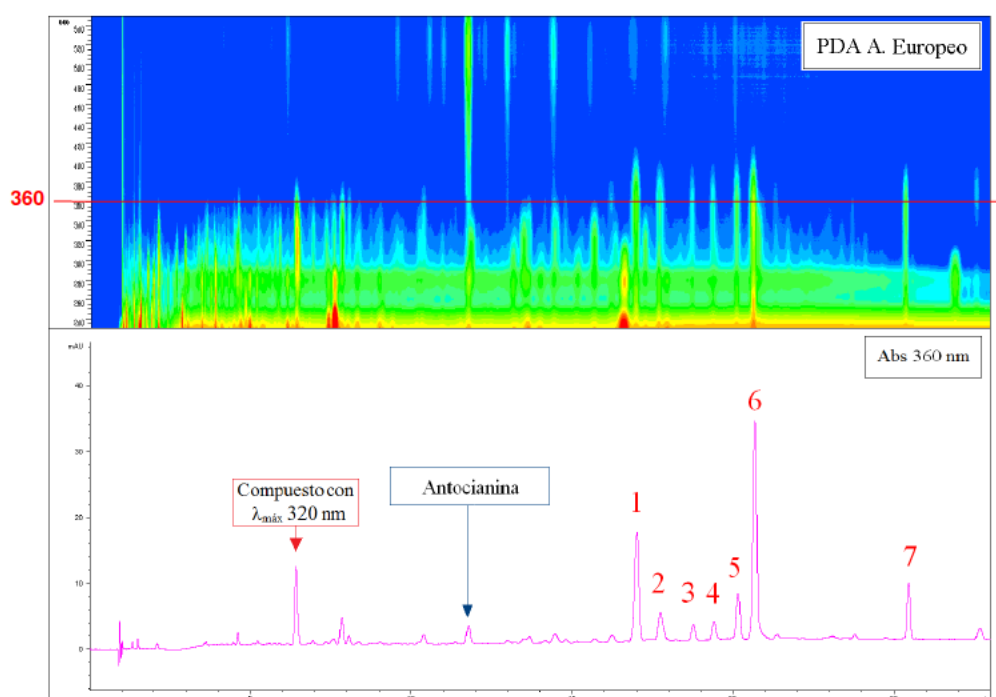
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Rodríguez-Medina <i>et al.</i> , 2009	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
Kaempferol	--	--	--	1,0
Kaempferol 3-O-glucósido	0,62	--	--	--
Quercetin	--	--	--	26
<u>Quercetin 3-O-galactósido</u>	8,99	3,2	X	--
Quercetin 3-O-glucósido	1,49	--	--	--
Quercetin 6-O-glucósido	--	--	X	--
<u>Quercetin 3-O-glucurónido</u>	--	--	X	--
Quercetin 3-O-xylosido	1,60	--	--	--
<u>Quercetin 3-O-arabinósido</u>	7,09	--	--	--
Quercetin 3-O-acetyl-rhamnósido	5,66	--	--	--
Miricetin	--	--	--	3,7
<u>Miricetin 3-O-arabinósido</u>	12,21	--	--	--
Miricetin 3-O-rhamnósido	1,03	--	--	--

#### 4.3.2.4.- ARÁNDANO EUROPEO (Cranberry; *Vaccinium oxycoccus L.*)

La muestra de arándano europeo analizada fue un zumo de 12,4 °Brix procedente de la casa comercial Grünewald (Austria).

##### ➤ Flavonoles presentes en el arándano europeo

El cromatograma general del arándano europeo obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.53.



**Figura 4.53:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm del arándano europeo.

Los picos asignados con los números del 1 al 7 se corresponden con los flavonoles detectados y su identificación se muestra en la Tabla 4.71. Como en los casos anteriores, para la identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto.

**Tabla 4.71:** Detección e identificación de los flavonoles del arándano europeo.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	17,0	20	255 y 354	Quercetin 3-O-glucopiranosido
2	17,8	5	254 y 354	Isorhamnetin 3-O-rutinósido
3	18,7	4	265 y 347	Kaempferol 3-O-glucósido
4	19,4	3	265 y 346	Kaempferol 3-O-rutinósido
5	20,2	6	255 y 353	Quercetin 3-O-rhamnósido
6	20,6	35	253 y 371	Miricetin 3-O-glucósido
7	25,2	10	--	n.i.

n.i. No identificado

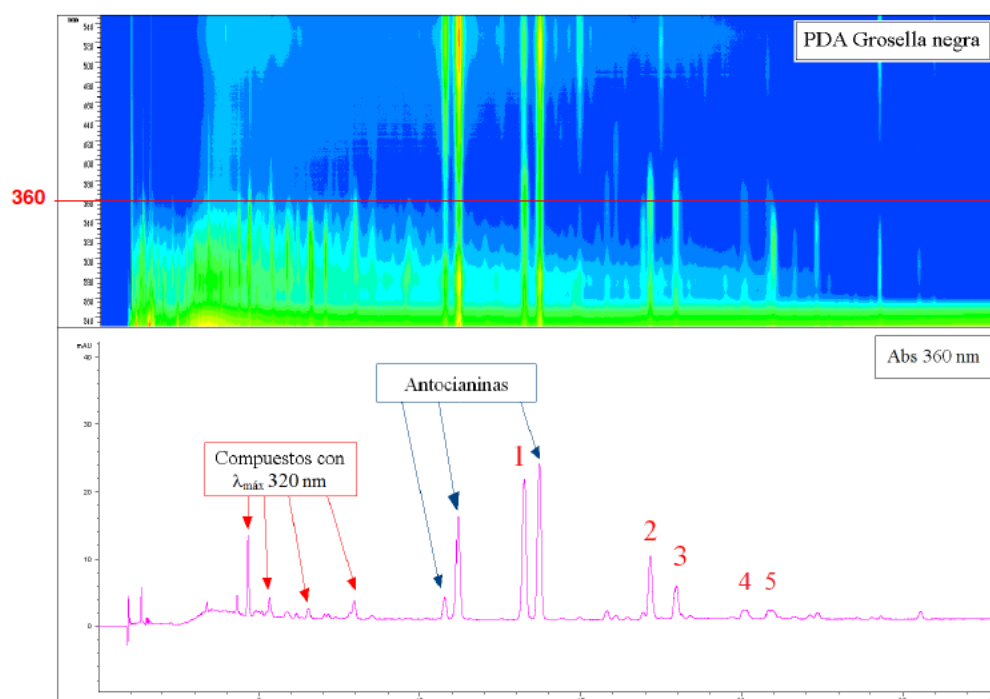
La bibliografía sobre los flavonoles presentes en el arándano europeo es escasa, tan solo está recogida la presencia de estos compuestos en la base de datos Phenol-Explorer, donde se indica la presencia de 0,51 mg/100 g de quercetin. A diferencia de estos datos y de la ausencia de información, se logró la detección de siete compuestos, de los que seis han sido identificados. Los compuestos identificados tienen como agliconas isorhamnetin, kaempferol y miricetin.

#### 4.3.2.5.- GROSELLA NEGRA (Blackcurrant; *Ribes nigrum* L.)

La muestra de grosella negra analizada fue un zumo con 12,7 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Flavonoles presentes en la grosella negra

El cromatograma general de la grosella negra obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.54.



**Figura 4.54:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la grosella negra.

A la absorbancia de 360 nm se detectan las antocianinas mayoritarias y otros compuestos que absorben a 320 nm. Los flavonoles corresponden a los picos numerados del 1 al 5 y la Tabla 4.72 muestra la identificación de los mismos que se realizó teniendo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto además, los resultados se contrastaron con los descritos por otros autores en las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.73.

**Tabla 4.72:** Detección e identificación de los flavonoles de la grosella negra.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	13,3	21	253 y 370	Miricetin 3-O-rutinósido
2	17,2	10	255 y 353	Quercetin 3-O-glucósido
3	18,0	7	255 y 371	Kaempferol 3-O-glucósido
4	20,1	2	253 y 371	Miricetin 3-O-glucósido
5	21,1	2	--	n.i.

(n.i.) No identificado

Se detectaron cinco flavonoles, cuatro se identificaron y uno no. Todos los compuestos identificados ya están descritos en la bibliografía. Sin embargo, no se ha logrado detectar la presencia de quercetin 3-O-rutinósido que la base de datos Phenol-Explorer describe a una concentración alta de 4,65 mg/100 g y Bermúdez-Soto & Tomás-Barberán (2004) de 0,33 g/L.

**Tabla 4.73:** Flavonoles presentes en la grosella negra según la bibliografía

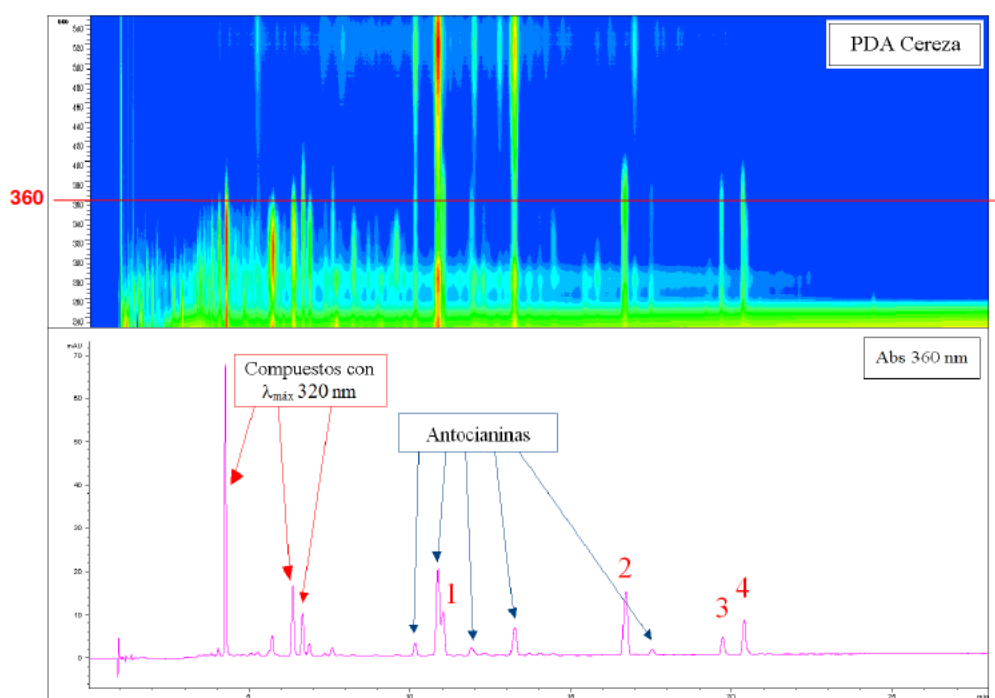
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Bermúdez-Soto & Tomás-Barberán 2004 (g/L)	Häkkinen <i>et al.</i> , 1999 (%)
Kaempferol	--	0,5	--	5,9
<u>Kaempferol 3-O-glucósido</u>	0,57	--	--	--
Quercetin	--	5,55	0,07	29,8
<u>Quercetin 3-O-glucósido</u>	2,61	--	0,11	--
Quercetin 3-O-rutinósido	4,65	--	0,33	--
Miricetin	--	6,64	--	15,5
<u>Miricetin 3-O-rutinósido</u>	3,14	--	--	--
<u>Miricetin 3-O-glucósido</u>	2,71	--	--	--

#### 4.3.2.6.- CEREZA (Sour cherry; *Prunus cerasus* L.)

La muestra de cereza analizada ha sido un zumo con 11,8 °Brix procedente de la casa comercial Mondifood (Bélgica).

##### ➤ Flavonoles presentes en la cereza

El cromatograma general de la cereza obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.55. En esta Figura se detectan las antocianinas presentes en la cereza y tres compuestos con un máximo de absorbancia a 320 nm además de los cuatro flavonoles numerados del 1 al 4. La identificación y condiciones de detección de éstos está recogida en la Tabla 4.74.



**Figura 4.55:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la cereza.

La identificación se hizo al igual que en los casos anteriores según el tiempo de retención y el espectro de absorbancia comparado con el de los patrones.

No hay muchos autores que hayan estudiado los flavonoles de la cereza, aunque al comparar los flavonoles identificados con los de la bibliografía, encontramos que quercetin 3-O-rutinósido y kaempferol 3-O-rutinósido han sido previamente descritos por otros autores.

**Tabla 4.74:** Detección e identificación de los flavonoles de la cereza.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	11,2	10	255 y 356	Quercetin 3-O-glucosil-rutinósido
2	16,7	18	256 y 356	Quercetin 3-O-rutinósido
3	19,8	5	265 y 346	Kaempferol 3-O-rutinósido
4	20,4	10	253 y 369	Miricetin 3-O-glucósido

Aunque no se ha detectado quercetin 3-O-glucósido como indica Chaovanalikit & Wrolstad (2004), sí se han identificado quercetin 3-O-glucosil-rutinósido y miricetin 3-O-glucósido que no han sido descritos previamente en la cereza.

**Tabla 4.75:** Flavonoles presentes en la cereza según la bibliografía

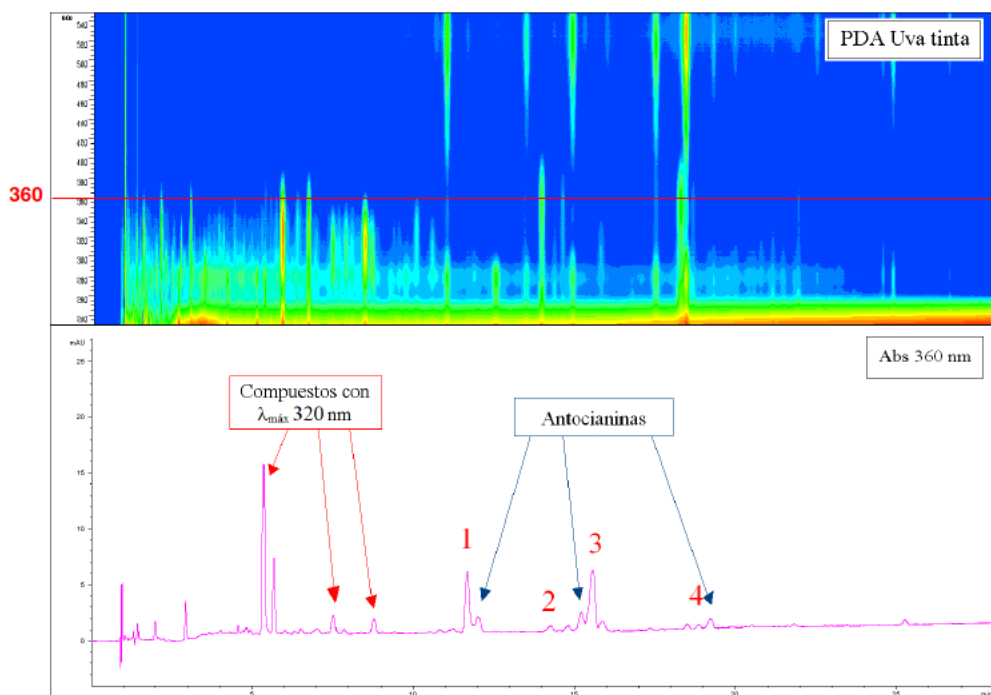
Identificación	Base de datos USDA (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Ferreti 2010	Chaovanalikit & Wrolstad 2004
Quercetin	2,92	2,30	--	--
<u>Quercetin 3-O-rutinósido</u>	--	2,01	X	X
Quercetin 3-O-glucósido	--	--	X	X
<u>Kaempferol 3-O-rutinósido</u>	--	--	X	X

#### 4.3.2.7.- UVA TINTA (Black grape; *Vitis vinifera* L.)

La muestra de uva tinta analizada ha sido un mosto tinto con 13 °Brix procedente de la casa comercial J. García Carrión S.A. (España).

##### ➤ Flavonoles presentes en la uva tinta

La Figura 4.56 muestra el cromatograma general de la uva tinta obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm, se indican las antocianinas, los compuestos con máxima longitud de onda a 320 nm y los flavonoles numerados del 1 al 4 cuya identificación está recogida en la Tabla 4.76. Para esta identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto, y se contrastó con lo descrito por otros autores en las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.77.



**Figura 4.56:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la uva tinta.

**Tabla 4.76:** Detección e identificación de los flavonoles de la uva tinta.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	11,7	6	253 y 369	Miricetin 3-O-arabinósido
2	14,3	1	256 y 356	Quercetin 3-O-rutinósido
3	15,5	5	255 y 354	Quercetin 3-O-glucurónido
4	19,0	1	254 y 354	Isorhamnetin 3-O-glucósido



En la bibliografía encontramos una gran diversidad de flavonoles descritos en la uva tinta, con pocas coincidencias entre los distintos autores probablemente debido a la amplia variedad de uva tinta que existe en el mercado como base para la elaboración de vino. En la uva tinta analizada en este trabajo se han identificado cuatro flavonoles. Tres de ellos habían sido previamente descritos: quercetin 3-O-glucurónido (Phenol-Explorer), quercetin 3-O-rutinósido (Fu *et al.* 2011 y Gómez-Alonso, 2007) e isorhamnetin 3-O-rutinósido (Gómez-Alonso, 2007); y un cuarto. Miricetin 3-O-arabinósido ha sido descrito por primera vez en la uva tinta, aunque ya estaba referenciada la presencia de su aglicón (Gómez-Alonso, 2007).

**Tabla 4.77:** Flavonoles presentes en la uva tinta según la bibliografía.

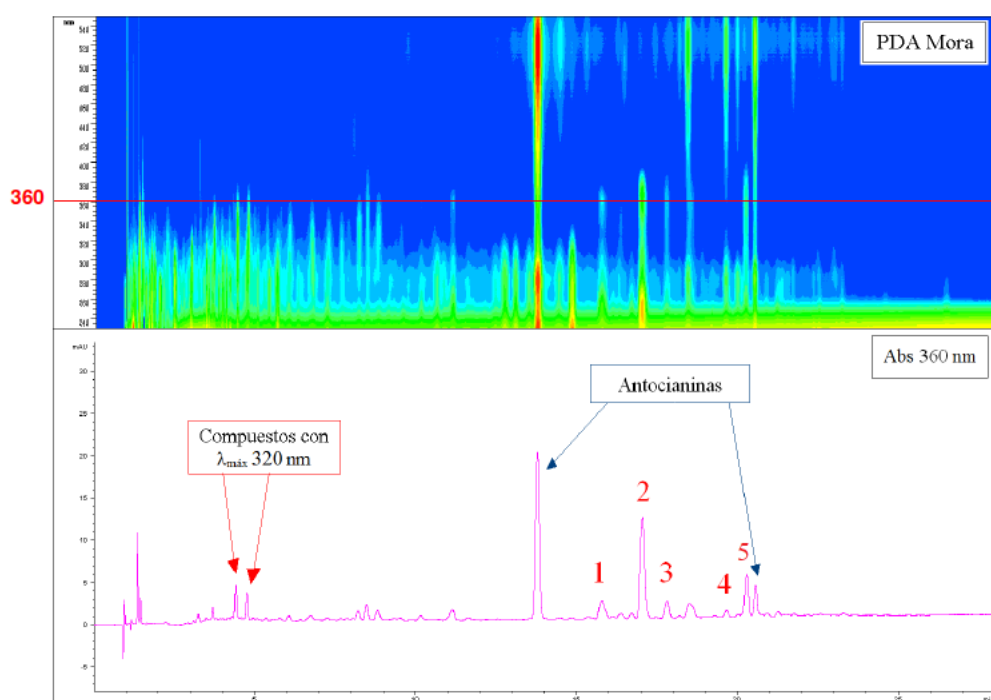
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Rodríguez- Medina <i>et al.</i> , 2009	Gómez-Alonso 2007 (%)	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007	Robards & Antolovich, 1997
Quercetin	--	2,54	--	X	0,53	--	X
Quercetin 3-O-glucósido	--	--	--	X	22,62	4,6	--
Quercetin 3-O-galactósido	0,93	--	--	X	4,22	--	--
Quercetin 6-O-glucurónido	--	--	--	X	14,02	--	--
<u>Quercetin 3-O-glucurónido</u>	2,15	--	--	--	--	--	--
<u>Quercetin 3-O-rutinósido</u>	--	--	0,79	--	3,35	--	--
Kaempferol	--	--	--	--	0,41	--	X
Kaempferol 3-O-rutinósido	--	--	--	--	2,74	--	--
Kaempferol 3-O-glucósido	--	--	--	--	4,84	--	--
Isorhamnetin	--	--	--	--	0,18	--	X
<u>Isorhamnetin 3-O-glucósido</u>	--	--	--	--	7,87	--	--
Miricetin	--	0,45	--	--	1,84	--	X
Miricetin 3-O-glucósido	--	--	--	X	--	9,4	--
Miricetin 3-O-glucopiranosido	--	--	--	X	--	--	--

#### 4.3.2.8.- MORA (Blackberry; *Rubus fruticosus* L.)

La muestra de mora analizada fue un puré con 11,1 °Brix procedente de la empresa J. García Carrión (España).

##### ➤ Flavonoles presentes en la mora

El cromatograma general de la mora obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.57.



**Figura 4.57:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm de la mora.

Los flavonoles identificados están numerados del 1 al 5 y su identificación se muestra en la Tabla 4.78. Para dicha identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto los resultados se contrastaron con las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.79.

**Tabla 4.78:** Detección e identificación de los flavonoles de la mora.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	11,5	3	253 y 369	Miricetin 3-O-arabinósido
2	15,2	15	255 y 353	Quercetin 3-O-galactósido
3	18,5	4	254 y 354	Isorhamnetin 3-O-rutinósido
4	19,1	1	265 y 347	Kaempferol 3-O-glucósido
5	19,5	5	255 y 353	Quercetin 3-O-rhamnósido

Diversos autores establecen la identificación de 1 o 2 flavonoles presentes en la mora a excepción de la base de datos de Phenol-Explorer que identifica un mayor número de compuestos. De los flavonoles detectados tan solo quercetin 3-O-galactósido ha sido previamente descrito en la mora. Sí se ha descrito la presencia de las agliconas (quercetin, kaempferol y miricetin) de cuatro de los flavonoles detectados. El isorhamnetin 3-O-rutinósido es la primera vez que se describe.

**Tabla 4.79:** Flavonoles presentes en la mora según la bibliografía

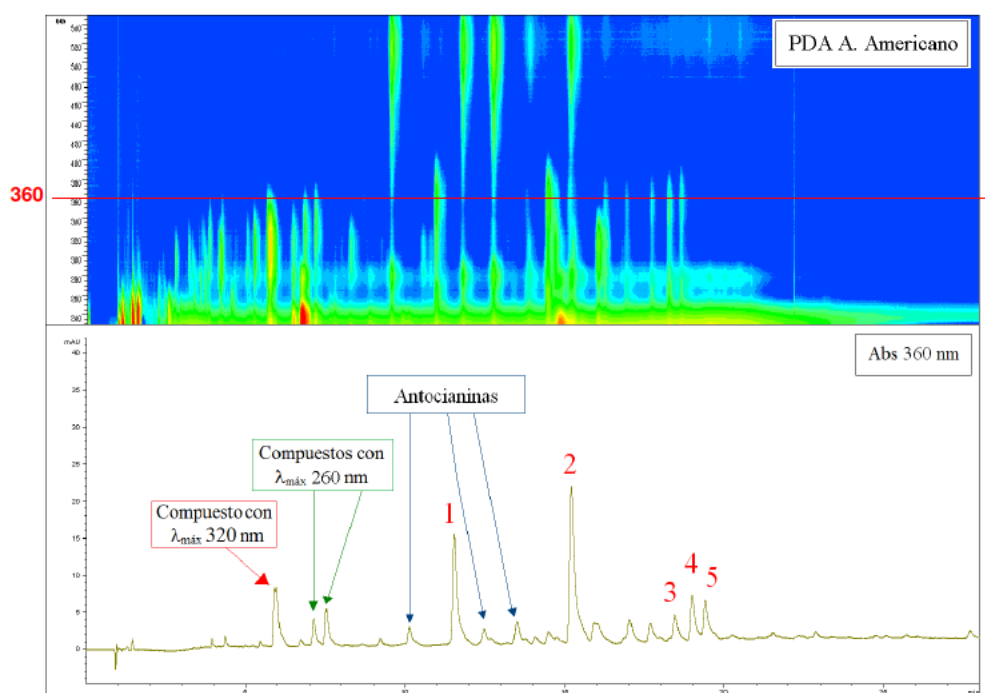
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Gancel <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Hager <i>et al.</i> 2010
Kaempferol	--	0,06	--	--
Quercetin	--	1,76	8,15	X
<u>Quercetin 3-O-galactósido</u>	4,10	--	--	--
Quercetin 3-O-glucósido	0,67	--	--	--
Quercetin 3-O-xylósido	1,28	--	--	--
Quercetin 3-O-rutinósido	3,89	--	--	X
Quercetin 3-O-xylosyl-glucurónido	2,37	--	--	--
Quercetin 3-O-glucosyl-xylósido	0,46	--	--	--
Miricetin	--	0,67	--	--

#### 4.3.2.9.- ARÁNDANO AMERICANO (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)

La muestra de arándano americano analizada fue un zumo concentrado con 63,1 °Brix procedente de la empresa Oceans Sprays (USA).

##### ➤ Flavonoles presentes en el arándano americano

El cromatograma general del arándano americano obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm se muestra en la Figura 4.58.



**Figura 4.58:** Cromatograma general y perfil de flavonoles a 360 nm del arándano americano.

Se detectan cinco flavan-3-oles marcados con los números del 1 al 5, además de antocianos y otros compuestos con longitudes de onda máximas a 260 y 320 nm. En la Tabla 4.80 se muestra el tiempo de retención y la longitud de onda máxima de los flavonoles detectados. Para su identificación se tuvo en cuenta fundamentalmente el tiempo de retención obtenido comparado con el de los patrones, y la coincidencia del espectro en ultravioleta visible de cada compuesto. Estos resultados se compararon con los descritos en las referencias bibliográficas que se muestran en la Tabla 4.81. Otros autores identifican en torno a 2 o 3 flavonoles en el arándano americano, a excepción de la base de datos Phenol-Explorer que logra la identificación de un mayor número de compuestos.

De los cinco flavonoles identificados cuatro ya han sido previamente descritos en el arándano americano.

**Tabla 4.80:** Detección e identificación de los flavonoles del arándano americano.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	11,8	15	253 y 369	Miricetin 3-O-arabinósido
2	15,4	22	255 y 356	Quercetin 3-O-galactósido
3	18,6	4	265 y 347	Kaempferol 3-O-glucósido
4	19,1	6	254 y 354	Isorhamnetin 3-O-rutinósido
5	19,7	5	255 y 354	Quercetin 3-O-rhamnósido

Se identifica aquí la isorhamnetina 3-O-glucósido mientras que el compuesto quercetin 3-O-arabinósido cuya presencia Phenol-Explorer la establece en 4,94 mg/100 g no se ha detectado.

**Tabla 4.81:** Flavonoles presentes en el arándano americano según la bibliografía

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Wang & Zuo, 2011 ( $\mu$ g/mL)	Chen & Zuo, 2007	Chen <i>et al.</i> , 2001 (mg/L)
Quercetin	--	15,09	193,8	--	--
<u>Quercetin 3-O-galactósido</u>	10,81	--	--	X	--
Quercetin 6-O-arabinósido	--	--	--	X	--
<u>Quercetin 3-O-rhamnósido</u>	6,17	--	--	--	--
Quercetin 3-O-arabinósido	4,94	--	--	--	--
Miricetin	--	6,78	86,9	X	8,3
<u>Miricetin 3-O-arabinósido</u>	5,30	--	--	--	--
Kaempferol	--	0,09	--	--	--
<u>Kaempferol 3-O-glucósido</u>	0,87	--	--	--	--

## OTRAS FRUTAS DE ALTO INTERÉS COMERCIAL

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las frutas más consumidas como la naranja, la manzana y el plátano. Estas frutas no fueron estudiadas en el apartado 4.1 por lo que realizamos en esta parte la identificación de todos los grupos de polifenoles con el análisis del método propuesto como alternativa al método IFU nº 71.

### 4.3.2.10.- NARANJA (Orange; *Citrus sinensis* L. Osbeck)

Los grupos de polifenoles analizados en la naranja fueron los siguientes: flavonoles, flavanonas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. En este caso no se analizaron los antocianos ya que esta fruta no los posee. En el caso de las naranjas, tan solo la naranja sanguina presenta antocianos.

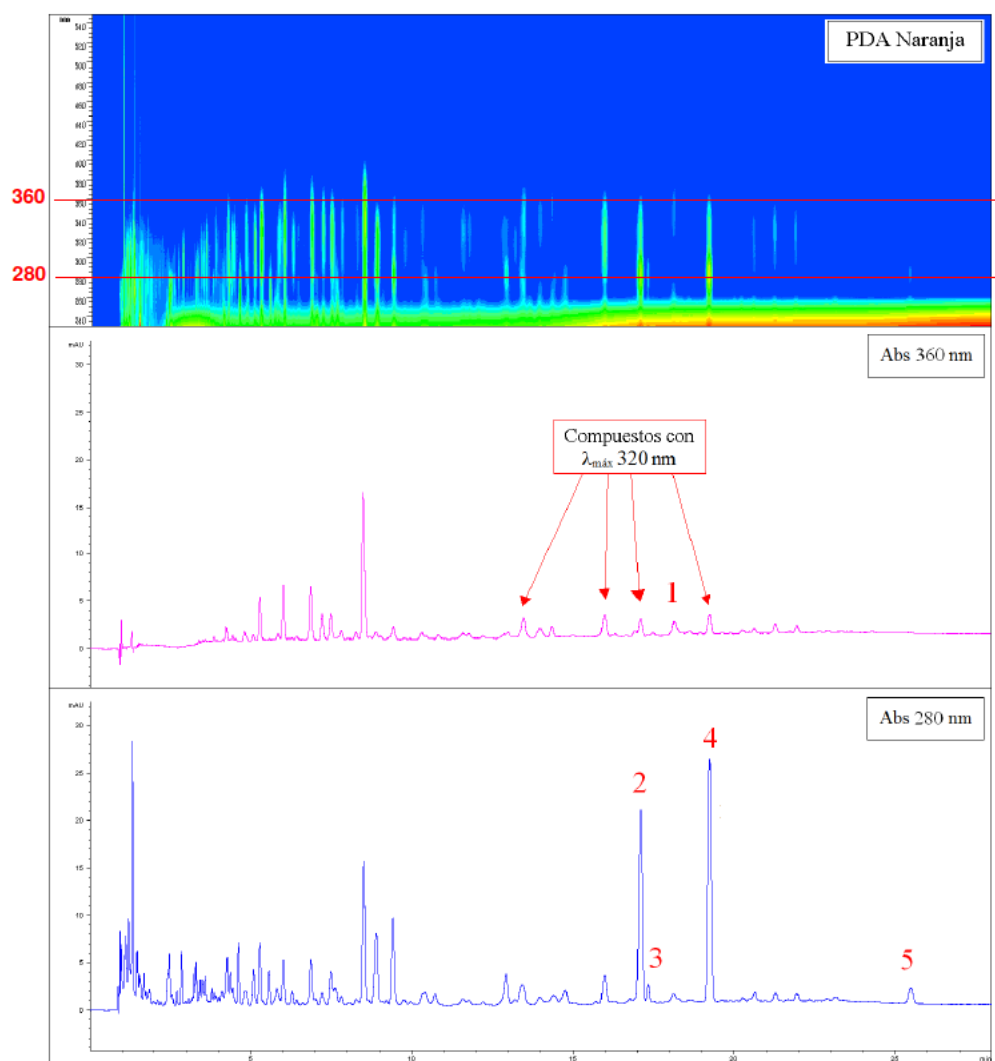
#### ➤ Flavonoles y flavanonas presentes en la naranja

El cromatograma general de la naranja obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), el perfil de los flavonoles obtenido a una absorbancia de 360 nm y el perfil de las flavanonas obtenido a 280 nm, se muestra en la Figura 4.59. En este caso, a diferencia de los análisis de las frutas anteriores, también se muestra el cromatograma de absorbancia a 280 nm para identificar las flavanonas, grupo de polifenoles característico de esta fruta.

En la Figura 4.59 correspondiente al perfil obtenido a una absorbancia de 360 nm, se detectan cuatro compuestos cuyo máximo de absorbancia es a 320 nm, y tan solo se ha identificado un flavonol (pico nº 1). En cuanto al perfil obtenido a 280 nm, se ha logrado la detección de 4 flavanonas, compuesto polifenólico característico de las naranjas (picos 2-5). La identificación de los compuestos de la Figura 4.59 se obtuvo con los espectros de absorbancia, el tiempo de retención de cada compuesto y comparando con los resultados descritos por otros autores (Tabla 4.85). En la Tabla 4.82 se muestran los resultados de la identificación.

**Tabla 4.82:** Detección e identificación de los flavonoles y flavanonas de la naranja.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm y 280 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	19,2	3	254 y 355	Isorhamnetin 7-O-rutinósido
2	17,0	21	281 y 331	Narirutin
3	17,2	3	283 y 332	Naringin
4	19,3	26	283 y 335	Hesperidin
5	25,4	3	282 y 331	Didimin



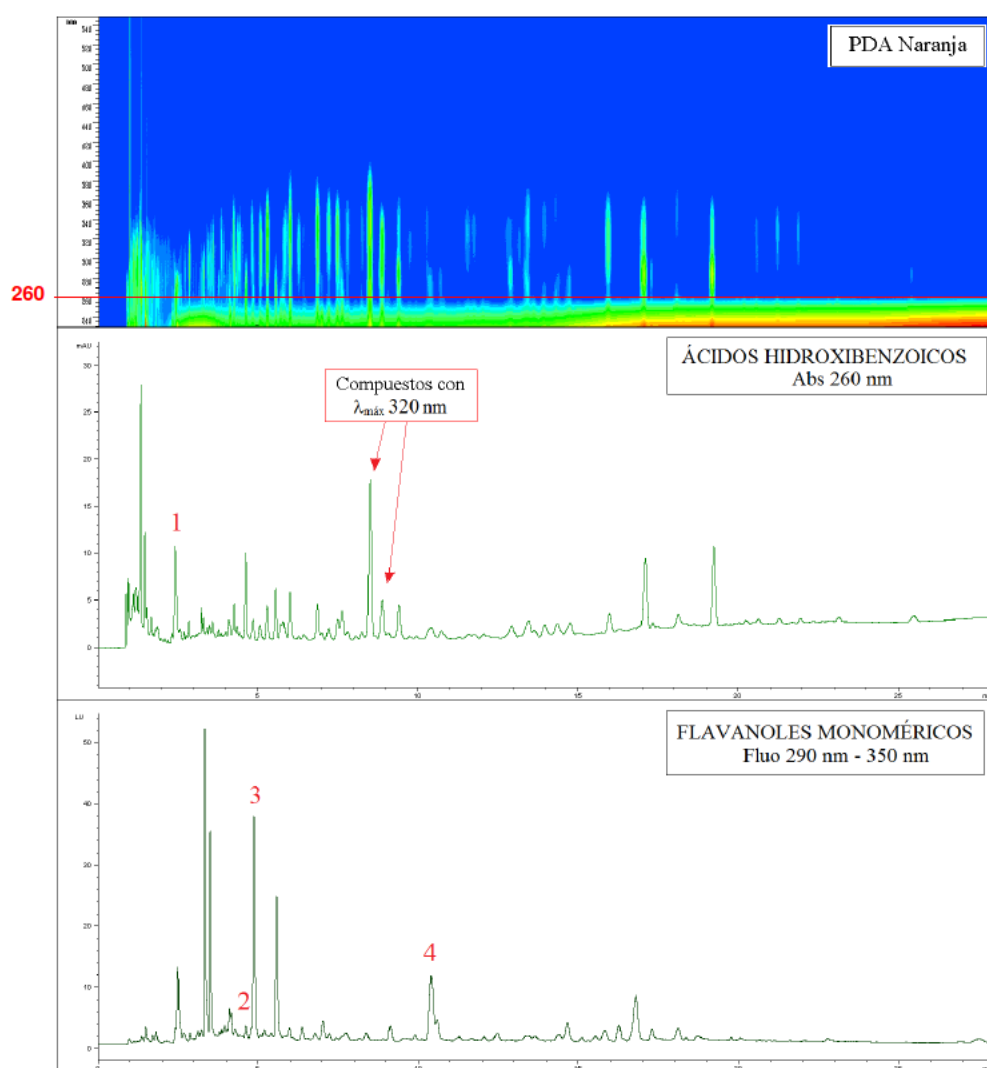
**Figura 4.59:** Cromatograma general, perfil de flavonoles a 360 nm y perfil de flavanonas de la naranja.

No hay muchos trabajos en los que hayan estudiado los flavonoles de la naranja y, de todos ellos, tan solo se ha identificado la presencia de quercetin. Nuestra identificación establece la presencia de isorhamnetin 7-O-rutinósido.

Respecto a las flavanonas, las cuatro detectadas en el presente estudio coinciden con las recogidas en la base de datos de Phenol-Explorer y han sido descritas por otros autores.

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en la naranja**

La Figura 4.60 muestra el cromatograma general de la naranja obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), el perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos obtenido a una absorbancia de 260 nm, y una fluorescencia de 290-350 nm.



**Figura 4.60:** Cromatograma general, perfil de flavan-3-oles a 260 nm y perfil de fluorescencia de la naranja.

La identificación de los compuestos de la Figura 4.60 corresponden con ácidos hidroxibenzoicos (pico nº 1) y flavan-3-oles monoméricos (picos nº 2, 3 y 4). La Tabla 4.83 muestra su identificación, la cual se obtuvo comparando con los espectros de absorbancia y el tiempo de retención.



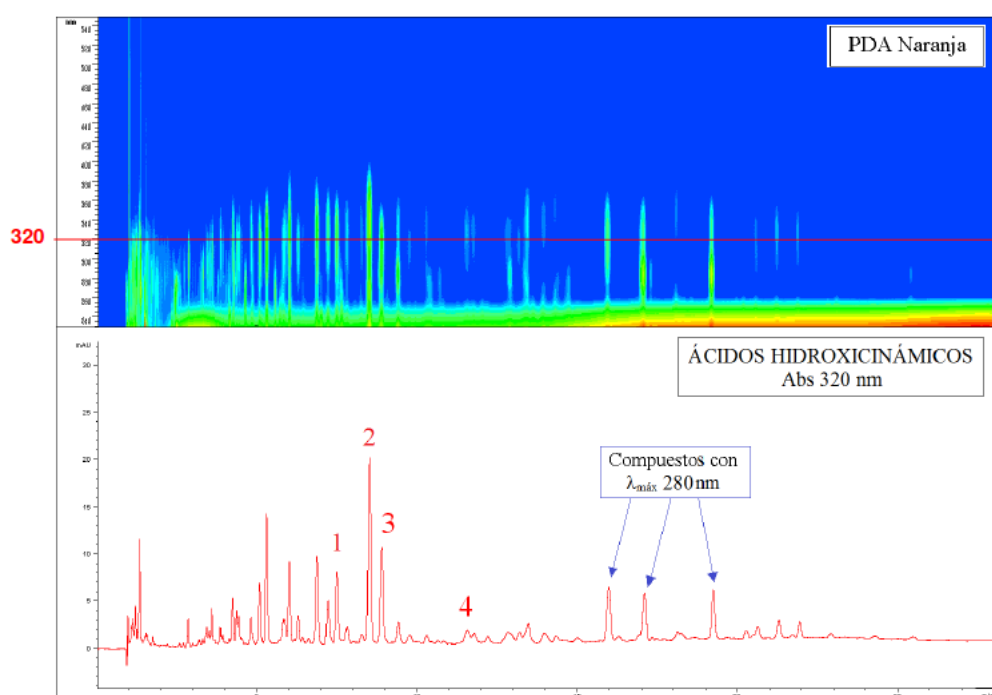
**Tabla 4.83:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la naranja.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 290-350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	2,3	11	12	269	Ácido gálico
2	4,7	--	3	--	(-)-Epigallocatequina
3	4,9	--	40	--	(+)-Catequina
4	10,3	--	12	--	(-)-Epicatequina

Los datos obtenidos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.85 no identifican ningún ácido hidroxibenzoico, flavan-3-ol monomérico ni estilbeno. En nuestro caso se logró la identificación de un ácido hidroxibenzoico (ácido gálico) y de tres flavan-3-oles monoméricos ((-)-epigallocatequina, (+)catequina y (-)-epicatequina) detectados en el perfil de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 290 nm y de emisión de 350 nm.

#### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la naranja

La Figura 4.61 muestra el cromatograma general de la naranja obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de ácidos hidroxicinámicos obtenido a una absorbancia de 320 nm.

**Figura 4.61:** Cromatograma general y perfil de los ácidos hidroxicinámicos a 320 nm de la naranja.

Los ácidos hidroxycinámicos presentes en la naranja están numerados en la Figura 4.61 con los números 1 al 4. La identificación de estos compuestos se muestra en la Tabla 4.84 la cual se realizó con los datos, los espectros de absorbancia y el tiempo de retención al que aparecen los compuestos.

**Tabla 4.84:** Detección e identificación de ácidos hidroxycinámicos de la naranja.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	7,3	8	325	Ácido clorogénico
2	8,4	20	310	Ácido <i>p</i> -Cumaroil glucosa
3	9,0	10	324	Ácido cafeico
4	11,8	3	324	Ácido ferúlico 4-O-glucosa

Pocos son los autores que han publicado datos sobre los ácidos hidroxycinámicos presentes en la naranja (Tabla 4.84), tan solo Fu *et al.* (2011) y Klimczak *et al.* (2007) establecen la presencia de este grupo de polifenoles. Se ha detectado la presencia de ácido clorogénico que, anteriormente, no había sido descrita. Además de los glicósidos de los ácidos *p*-Cumárico y ferúlico. Klimczak *et al.* (2007) indica la presencia de ácido sinápico pero nosotros no hemos conseguido su identificación, además, este autor describe la presencia de los ácidos *p*-Cumárico y ferúlico, agliconas correspondientes con los de los ácidos hidroxycinámicos detectados aquí.

**Tabla 4.85:** Polifenoles presentes en la naranja según la bibliografía.

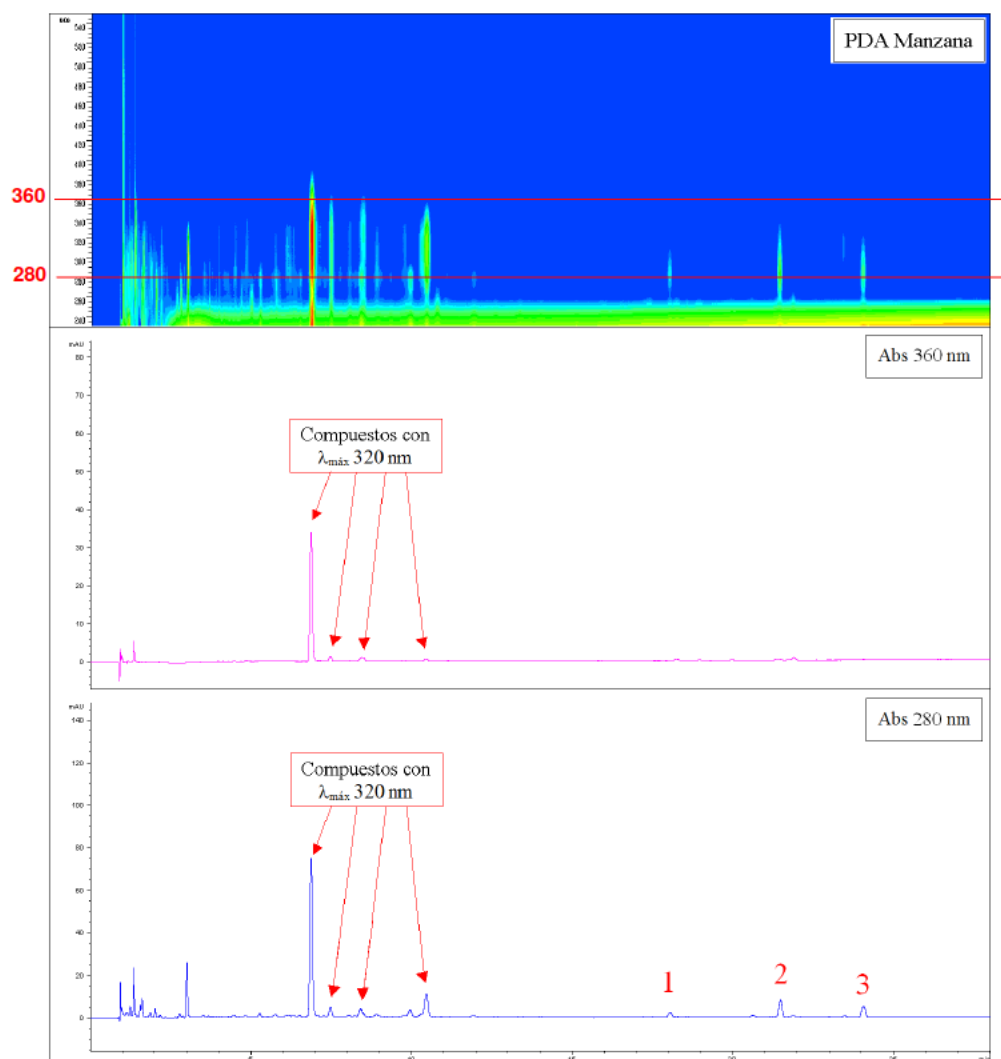
Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Cheigh <i>et al.</i> , 2012 (mg/g)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Andreu-Navarro <i>et al.</i> , 2010 (µg/mL)	Klimczak <i>et al.</i> , 2007 (mg/L)	Nacz & Shahidi 2006	Robards & Antolovich 1997
FLAVONOLES								
Quercetin	1,06	0,20	--	0,70	360	--	--	--
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS								
Ácido cafeico	--	--	--	--	--	8,2	--	--
<u>Ácido ferúlico</u>	--	--	--	0,45	--	0,6	--	--
Ácido <i>p</i> -Cumárico	--	--	--	--	--	0,5	--	--
Ácido sinápico	--	--	--	--	--	0,7	--	--
FLAVANONAS								
<u>Hesperidin</u>	25,85	--	72	--	194,8	76,9	X	X
<u>Narirutin</u>	5,36	--	11,7	--	--	70,2	X	X
Neohesperidin	0,06	--	--	--	--	--	--	--
Hesperetin	--	21,87	--	--	--	--	X	--
<u>Naringin</u>	0,07	--	--	--	85,8	--	--	--
Naringenin	--	7,10	--	--	248	--	--	--
<u>Didimin</u>	5,93	--	--	--	--	9,9	X	--
Eriocitrin	0,36	--	--	--	--	--	--	X
Narirutin 4-O-glucosa	--	--	--	--	--	--	--	X
Naringenin 7-O-neohesperidosido	--	--	--	--	--	--	X	--
Naringenin 7-O-rutinósido	--	--	--	--	--	--	X	--

#### 4.3.2.11.- MANZANA (Apple; *Malus domestica* Borkh)

Los grupos de polifenoles analizados en la manzana fueron: flavonoles, dihidrochalconas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. En este caso no se analizaron los antocianos ni las flavanonas ya que esta fruta no las posee. A diferencia del resto de las frutas estudiadas, la manzana es la única con presencia de dihidrochalconas.

##### ➤ Flavonoles y dihidrochalconas presentes en la manzana

En la Figura 4.62 podemos observar el cromatograma general de la manzana obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), el perfil obtenido por absorbancia a 360 nm que identifica los flavonoles y el perfil de absorbancia a 280 nm que muestra las dihidrochalconas.



**Figura 4.62:** Cromatograma general, perfil de flavonoles a 360 nm y perfil de dihidrochalconas de la manzana.

La Tabla 4.86 muestra la identificación de flavonoles y dihidrochalconas presentes en la manzana los cuales se identificaron comparando su espectro de absorbancia, el tiempo de retención y los datos bibliográficos de la Tabla 4.89.

**Tabla 4.86:** Detección e identificación de los flavonoles y dihidrochalconas de la manzana.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 360 nm y 280 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	18,0	5	--	n.i.
2	21,4	10	281	Floretina 2`O xiloxil-glucósido
3	24,0	5	280	Floridzina

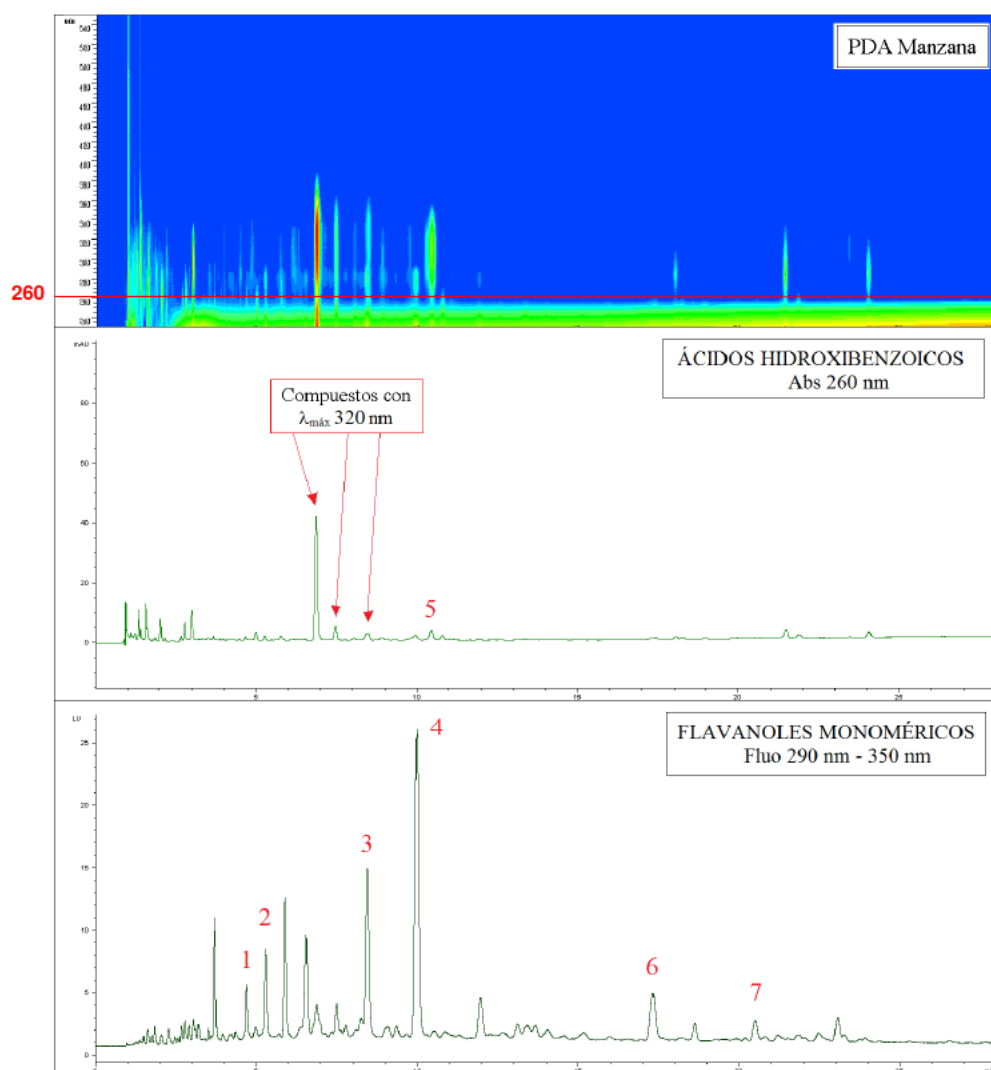
(n.i.) No identificado

En esta fruta no se ha logrado detectar ningún flavonol ya que, en el perfil obtenido a la absorbancia de 360 nm solo se detectan picos correspondientes a compuestos cuyo máximo es de 320 nm. Diversos autores como Naczk & Shahidi (2006) indican la presencia de cuatro flavonoles en la manzana como kaempferol, quercetin y sus glicósidos, pero en bajas concentraciones.

Respecto a la presencia de dihidrochalconas en la manzana, en la Figura 4.62 se muestra el perfil de absorbancia a 280 nm y se han identificado 3 dihidrochalconas correspondientes con los picos nº 1, 2 y 3, aunque uno de ellos no se logró identificar. Posiblemente, dicho pico corresponda con floretina tal y como indica Robards & Antolovich (2007). Las otras dos dihidrochalconas detectadas han sido previamente descritas en la manzana por otros autores (Tabla 4.88).

➤ **Ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en la manzana**

La Figura 4.63 muestra el cromatograma general de la manzana obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), el perfil de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos obtenido a una absorbancia de 260 nm, y una fluorescencia de 290-350 nm.



**Figura 4.63:** Cromatograma general, perfil de flavan-3-oles a 320 nm y perfil de fluorescencia de la manzana.

En la Figura 4.63 podemos observar como el perfil obtenido por absorbancia a 260 nm detecta un ácido hidroxibenzoico (pico nº 5), además de la presencia de otros compuestos con máximos de absorbancia a 320 nm. Como diferencia, en el perfil obtenido por fluorescencia se identifican mejor los compuestos pertenecientes a flavan-3-oles monoméricos, de los que se identifican cuatro (picos nº 1, 2 3 y 4) y estilbenos, de los que se identifican dos (picos nº 6 y 7).

Las características espectroscópicas y cromatográficas, y la identificación de todos estos compuestos se muestran en la Tabla 4.87.

**Tabla 4.87:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos de la manzana.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 290-350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	4,6	--	5	--	(-)-Epigallocatequina
2	5,4	--	8	--	(+)-Catequina
3	8,6	--	15	--	(-)-Epigallocatequina galato
4	10,1	--	25	--	(-)-Epicatequina
5	10,2	5	2	324	Ácido sirínico
6	17,1	--	5	--	Resveratrol 3-O-glucósido
7	20,7	--	3	--	Resveratrol

La identificación de los flavan-3-oles monoméricos es acorde a los datos de otros autores, sin embargo solamente Rodríguez-Medina *et al.* 2009 identifica un ácido hidroxibenzoico en la manzana correspondiente al ácido 3,4 dihidroxibenzoico 4-O-glucósido el cual nosotros no identificamos aunque sí detectamos ácido sirínico que otros autores no identifican.

Respecto a los estilbenos, se ha identificado la presencia de resveratrol y resveratrol 3-glucósido (piceido), como indica Huang & Mazza (2011), mientras que Piotrowsca *et al.*, (2012) detecta piceanato en la manzana.

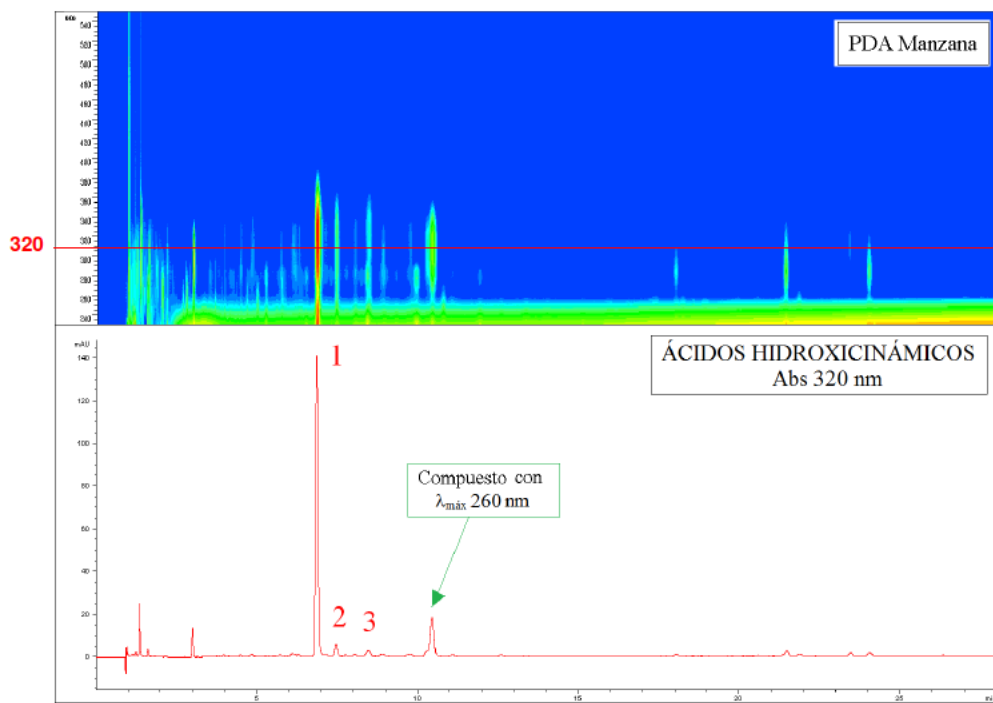
Como ácidos hidroxibenzoicos solo se detecta el ácido sirínico, en la bibliografía solo se ha descrito en un caso (Rodríguez-Medina *et al.* 2009) la presencia de ácido 3,4 dihidroxibenzoico-4-glucosa.

Respecto a los flavan-3-oles monoméricos, todos los identificados en el presente trabajo han sido previamente descritos (Tabla 4.89).

De los estilbenos se han detectado dos, y solo el resveratrol está previamente descrito en la manzana.

### ➤ Ácidos hidroxicinámicos presentes en la manzana

La Figura 4.64 muestra el cromatograma general de la manzana obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) y el perfil de ácidos hidroxicinámicos obtenido a una absorbancia de 320 nm.



**Figura 4.64:** Cromatograma general y perfil de ácidos hidroxicinámicos a 320 nm de la manzana.

Se identificaron 3 ácidos hidroxicinámicos en la manzana. La Figura 4.64 muestra además la presencia de un compuesto cuyo máximo se establece en 260 nm. La identificación de estos compuestos se muestra en la Tabla 4.88 y ha sido realizada por comparación con los espectros en absorbancia, los tiempos de retención y los datos de la bibliografía mostrados en la Tabla 4.89.

**Tabla 4.88:** Identificación de ácidos hidroxicinámicos de la manzana.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 320 nm (UA)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	6,8	140	325	Ácido clorogénico
2	7,6	6	310	Ácido <i>p</i> -Cumárico glucosa
3	10,3	20	324	Ácido cafeico

Los tres ácidos hidroxicinámicos encontrados han sido previamente referenciados en esta fruta (Tabla 4.89). La base de datos Phenol-Explorer, cromadex.com y autores como Karaman *et al.* 2010 indican la presencia de ácido *p*-Cumárico y derivados de éste. Nosotros hemos detectado ácido *p*-Cumárico glucosa como derivado de éste



compuesto, aunque el compuesto que más destaca en la manzana es el ácido clorogénico.

**Tabla 4.89:** Polifenoles presentes en la manzana según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base datos USDA (mg/100g)	Cromadex.com	Piotrowska 2012 (ng/mL)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Huang & Mazza 2011 (ng/g)	Karaman <i>et al.</i> , 2010 (mg/L)	Rodríguez- Medina 2009	Kumazawa 2007 (μmol/100g)	Nacz & Shahidi 2006	Tsanova-Sanova 2005 (%)	Robards & Antolovich 1997
FLAVONOLES												
Kaempferol	--	--	--	--	0,8	--	--	--	--	--	--	--
Quercetin	--	4,5	X	--	--	--	--	--	--	--	--	X
Quercetin 3-O-galactósido	--	--	--	--	--	--	--	X	--	X	--	--
Quercetin 3-O-glucósido	--	--	--	--	--	--	--	X	--	X	--	--
Quercetin 3-O-rutinósido	0,3	--	X	--	--	--	--	--	--	X	--	--
Quercetin 3-O-rhamnósido	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--
FLAVAN-3-OLES												
<u>Catequina</u>	2,0	1,5	X	--	--	--	76	--	--	X	9,3	X
<u>Epicatequina</u>	4,5	4,7	X	--	--	--	3,3	--	6,5	X	51	X
<u>Epigallocatequina</u>	--	0,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<u>Epigallocatequina galato</u>	--	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Epigallocatequina 3-O-glucosa	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS												
3,4 dihidroxibenzoico 4-O-glucosa	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--
ESTILBENOS												
Piceido	--	--	--	--	--	100	--	--	--	--	--	--
<u>Resveratrol</u>	--	--	--	62	--	--	--	--	--	--	--	--
Piceanatul	--	--	--	15	--	--	--	--	--	--	--	--
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS												
<u>Ácido p-Cumaroil glucosa</u>	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--
<u>Ácido clorogénico</u>	2,6	--	--	--	1,1	--	41	X	26	X	--	--
<u>Ácido cafeico</u>	1,1	--	X	--	--	--	3,1	--	--	--	--	--
Ácido p-Cumaroil quínico	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--
Ácido p-Cumárico	0,7	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--
DIHIDROCHALCONAS												
Floretina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X
Floretina 2'-O-xilosil- glucósido	3,2	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--
Floridzina	5,5	--	--	--	--	--	1,1	--	--	X	--	--

#### 4.3.2.12.- PLÁTANO (Banana; *Musa cavendishii* L.)

Los grupos de polifenoles analizados en el plátano fueron: flavonoles, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos. En este caso no se analizaron antocianos (predominantes en las frutas rojas), flavanonas (compuestos característicos de la naranja) o dihidrochalconas (compuestos de la manzana) ya que esta fruta no las posee.

##### ➤ Flavonoles presentes en el plátano

Observando el cromatograma general del plátano (Figura 4.65) obtenido con el detector de fotodiodos (PDA) no se ha obtenido ningún pico correspondiente a la presencia de flavonoles.

Como discrepancia, de todos los autores estudiados y mostrados en la Tabla 4.90, solamente Fu *et al.* (2011) establece la presencia de kaempferol y miricetin 3-O-glucósido pero en pequeñas cantidades.

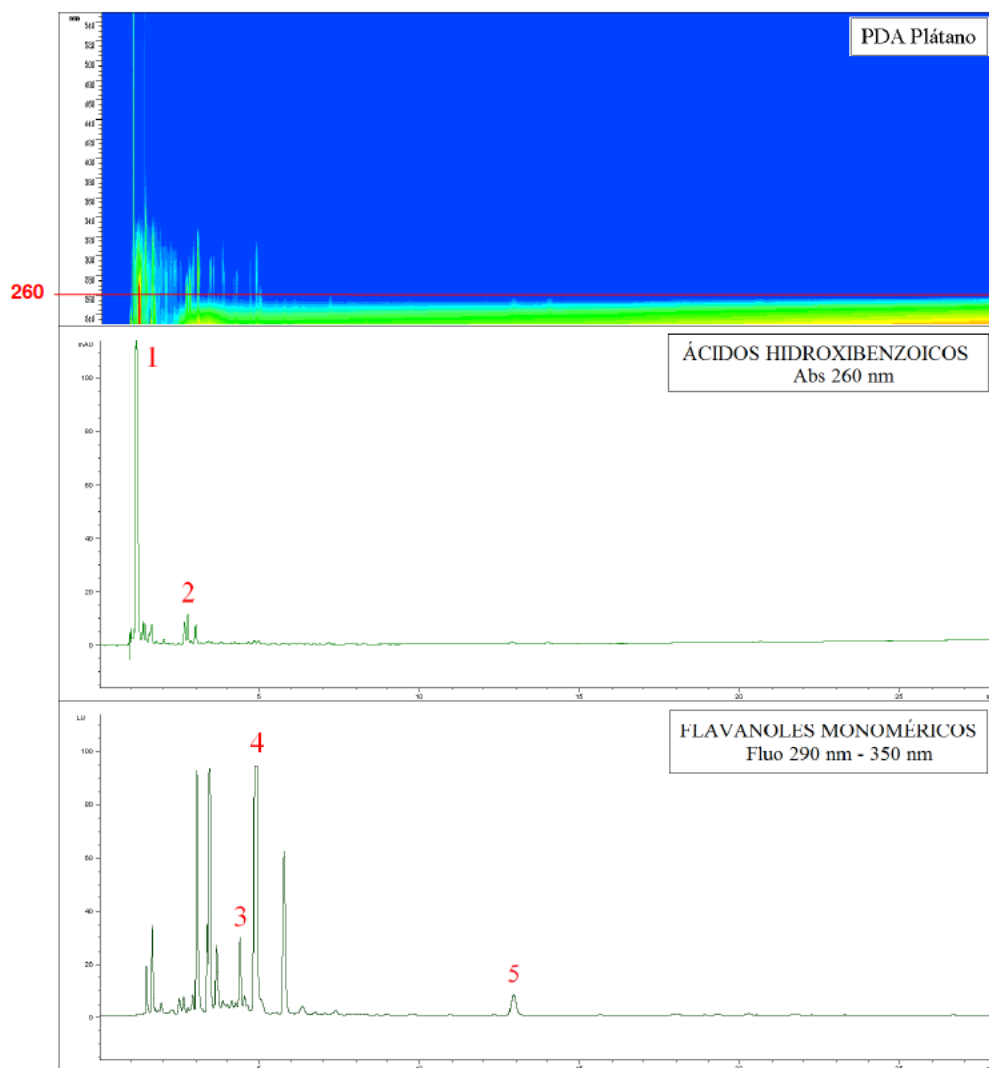
##### ➤ Ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles monoméricos en el plátano

La Figura 4.65 muestra el cromatograma general del plátano obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), el perfil de ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles monoméricos obtenido a una absorbancia de 260 nm y una fluorescencia de 290-350 nm.

Los picos detectados a una absorbancia de 260 nm corresponden con la presencia del ácido ascórbico (pico nº 1), dos ácidos hidroxibenzoicos (picos nº 2 y 5) y dos flavan-3-oles monoméricos (picos nº 3 y 4) cuya identificación se muestra en la Tabla 4.90.

**Tabla 4.90:** Detección e identificación de ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles monoméricos del plátano.

Nº	Tiempo retención (minutos)	Absorbancia a 260 nm (UA)	Fluorescencia 290-350 nm (UE)	Espectro de Absorbancia $\lambda$ máx (nm)	Identificación del compuesto
1	1,02	110	--	243	Ácido ascórbico
2	2,6	18	6	271	Ácido gálico
3	4,5	--	25	--	(-)-Epigallocatequina
4	4,9	3	100	280	(+)-Catequina
5	13,01	--	10	--	Ácido elágico



**Figura 4.65:** Perfil de ácidos hidroxibenzoicos a 260 nm y perfil de fluorescencia a 290-350 nm del plátano.

La identificación de los ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles monoméricos en el plátano se obtuvo por comparación de los espectros en absorbancia, el tiempo de retención de los compuestos y se comparó con los datos obtenidos por otros autores mostrados en la Tabla 4.91.

De los ácidos hidroxicinámicos identificados, está descrita la presencia del ácido gálico pero el ácido elágico es la primera vez que se describe en esta fruta. Respecto a los flavan-3-oles monoméricos, los dos detectados coinciden con los descritos por otros autores (Tabla 4.91).

➤ **Ácidos hidroxicinámicos presentes en el plátano**

No se obtuvo ninguna identificación de ácidos hidroxicinámicos en el plátano. Dicha identificación ha de establecerse a una absorbancia de 320 nm pero si observamos la Figura 4.65 correspondiente al cromatograma general del plátano obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), y trazamos una línea a 320 nm podremos observar como no hay compuestos a dicha longitud de onda.

En la Tabla 4.91 se recogen los datos bibliográficos obtenidos para esta fruta y, podemos observar como ninguno de los autores identifica la presencia de ácidos hidroxicinámicos en el plátano.

**Tabla 4.91:** Polifenoles presentes en el plátano según la bibliografía.

Identificación	Phenol-Explorer (mg/100g)	Base de datos USDA (mg/100g)	Fu <i>et al.</i> , 2011 (mg/100g)	Verde-Mendez <i>et al.</i> , 2003 (mg/100g)
FLAVONOLES				
Kaempferol	--	--	2,06	--
Miricetin 3-O-glucósido	--	--	1,0-7,3	--
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS Y FLAVAN-3-OLES				
<u>Ácido gálico</u>	1,00	--	0,30	1,06
<u>(+)-Catequina</u>	1,34	6,10	--	10,2
<u>(-)-Epicatequina</u>	0,11	0,02	--	--
<u>(-)-Epigallocatequina</u>	2,1*10 <sup>-3</sup>	--	--	--

#### 4.3.3.- Recopilación de los datos de ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos identificados en las frutas: naranja, manzana y plátano

La Tabla 4.92 recopila la identificación de los ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos presentes en las frutas de naranja, manzana y plátano. La duración del cromatograma fue de 30 minutos.

La propuesta de identificación de todos estos compuestos se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, su espectro obtenido en ultravioleta visible y fluorescencia y por comparación con los datos aportados por la bibliografía.

**Tabla 4.92:** Ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos identificados en la naranja, manzana y plátano.

Compuestos	Tiempo retención (minutos)	Grupo polifenólico	Naranja	Manzana	Plátano
Ácido gálico	2,4	Ác. hidroxibenzoico	X		X
(-)-Epigallocatequina	4,6	Flavan-3-ol monomérico	X	X	X
(+)-Catequina	5,1	Flavan-3-ol monomérico	X	X	X
Ácido clorogénico	6,9	Ác. hidroxicinámico	X	X	
Ácido <i>p</i> -Cumárico 3-O-glucósido	7,8	Ác. hidroxicinámico	X	X	
(-)-Epigallocatequina 3-O-galato	8,6	Flavan-3-ol monomérico		X	
(-)-Epicatequina	10,1	Flavan-3-ol monomérico	X	X	
Ácido sirínico	10,2	Ác. hidroxibenzoico		X	
Ácido cafeico	10,3	Ác. hidroxicinámico	X	X	
Ácido férulico 4-O-glucósido	11,8	Ác. hidroxicinámico	X		
Ácido elágico	13,1	Ác. hidroxibenzoico			X
Resveratrol 3-O-glucosa	17,1	Estilbeno		X	
Resveratrol	20,7	Estilbeno		X	

#### **4.3.4.- Recopilación de los datos de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas identificados en las frutas estudiadas**

La Tabla 4.93 muestra los 16 flavonoles, 4 flavanonas y 2 dihidrochalconas identificados en un cromatograma de 30 minutos de duración.

##### **- Flavonoles**

La propuesta de identificación de los flavonoles en las frutas analizadas se realizó atendiendo fundamentalmente al tiempo de retención en que aparecían los picos de los patrones en los cromatogramas, su espectro obtenido en ultravioleta visible a 360 nm y por comparación con los datos aportados por la bibliografía. La gran diversidad de flavonoles existente, sobre todo en las frutas rojas, ha llevado a este modo de identificar los compuestos.

El perfil cromatográfico de cada fruta fue diferente aunque no se encontró ningún compuesto específico para una fruta concreta, por lo que se sugiere que no es posible emplear el perfil de flavonoles como “huella dactilar” de los zumos de frutas. Sin embargo, podría ser útil para confirmar la presencia de una fruta en concreto como por ejemplo la cereza en la que hemos identificado quercetin 3-O-glucosil-rutinósido.

En el caso de la mora y el arándano americano los flavonoles identificados son los mismos en ambos casos por lo que una bebida con ambas frutas sería difícil de distinguir solo centrándonos en la identificación de los flavonoles que contiene.

En cuanto al plátano y la manzana, fueron las dos únicas frutas en las que no detectó ningún flavonol.

##### **- Flavanonas**

La propuesta de identificación de flavanonas solo se realizó en la naranja ya que es la única de las frutas estudiadas en la que podemos distinguir este grupo polifenólico en su composición. Dicha identificación ha sido obtenida mediante comparación de los datos obtenidos en los cromatogramas a 280 nm de absorbancia y los datos descritos en la bibliografía.

##### **- Dihidrochalconas**

La propuesta de identificación de las dihidrochalconas se realizó solamente en la manzana ya que es la única fruta de las estudiadas que contiene estos compuestos. La identificación ha sido obtenida mediante comparación de los datos obtenidos en los cromatogramas a 280 nm de absorbancia y los datos descritos en la bibliografía.

**Tabla 4.93:** Flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas identificados en las frutas estudiadas.

Identificación	Grupo al que pertenece	Tiempo retención (minutos)	Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza	Uva tinta	Mora	Arándano americano	Naranja	Manzana	Plátano
Quercetin 3-O-glucosil-rutinósido	Flavonol	11,01						X						
Myricetin 3-O-arabinósido	Flavonol	11,72			X				X	X	X			
Myricetin 3-O-rutinósido	Flavonol	13,01	X	X			X							
Quercetin 3-O-arabinósido	Flavonol	14,49			X									
Quercetin 3-O-rutinósido	Flavonol	14,85	X	X				X	X					
Quercetin 3-O-galactósido	Flavonol	15,10			X					X	X			
Quercetin 3-O-glucurónido	Flavonol	15,50	X		X				X					
Quercetin 3-O-glucósido	Flavonol	16,10	X				X							
Narirutina	Flavanona	16,85										X		
Quercetin 3-O-glucopiranosido	Flavonol	16,98				X								
Isorhamnetin 3-O-rutinósido	Flavonol	17,95				X				X	X			
Kaempferol 3-O-glucósido	Flavonol	18,84	X			X	X			X	X			
Naringina	Flavanona	18,07										X		
Isorhamnetin 3-O-glucósido	Flavonol	19,00							X					
Isorhamnetin 7-O-rutinósido	Flavonol	19,01										X		
Kaempferol 3-O-rutinósido	Flavonol	19,74			X	X		X						
Quercetin 3-O-rhamnosido	Flavonol	19,72				X				X	X			
Myricetin 3-O-glucósido	Flavonol	20,38				X								
Floretina 2'O xilosil-rutinósido	Dihidrochalcona	21,41					X	X					X	
Hesperidina	Flavanona	21,80										X		
Flordizina	Dihidrochalcona	24,06											X	
Didimin	Flavanona	24,97										X		





#### **4.4.- “Cuantificación de polifenoles totales en los zumos de frutas”**

Tomando como base los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se estudia ahora el empleo del método de análisis por UHPLC-PDA-Fluo para obtener no solo el perfil sino también la cantidad de polifenoles en zumos de frutas. La finalidad es llegar a determinar de forma rápida y sencilla el perfil y contenido en polifenoles totales individuales TIP (Total Individual Polyphenols). Los zumos estudiados se analizaron además con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Skergel *et al.*, 2005) habitualmente utilizado en la determinación inespecífica de fenoles totales TP (Total Polyphenols). Este método colorimétrico da positivo también con la vitamina C, llegándose a sobrevalorar el contenido en fenoles totales, por lo que es necesario expresar los resultados sustrayendo el contenido en vitamina C, que ha de ser analizado por otro método.

Así, se van a cuantificar los polifenoles totales mediante dos métodos: Folin-Ciocalteu y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (UHPLC) y se van a comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

##### **4.4.1.- Cuantificación por UHPLC de polifenoles individuales en zumos de fruta**

En el apartado 4.1, modificando el método IFU nº 71 de detección de antocianos por HPLC, se han analizado antocianos, betalaínas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos, estilbenos y colorantes alimentarios; y en el apartado 4.3, con el nuevo método optimizado por UHPLC, se han analizado flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas. Ahora, para establecer la cuantificación de los polifenoles totales en las frutas tenemos que analizar todos los grupos de polifenoles previamente estudiados.

La cuantificación de los polifenoles se realizó seleccionando un patrón estándar de cada grupo de polifenoles al que referir los cálculos. La Tabla 4.94 muestra la relación de los patrones estudiados y sus características de detección.

**Tabla 4.94:** Características de detección de los patrones estándar seleccionados.

Grupo de polifenoles	Patrón seleccionado	Detección	
		Absorbancia	Fluorescencia
Vitaminas	Ácido ascórbico	243 nm	--
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico	260 nm	$\lambda_{exc}$ 290 - $\lambda_{emi}$ 350 nm
Flavanoles monoméricos	(+)-Catequina	260 nm	$\lambda_{exc}$ 290 - $\lambda_{emi}$ 350 nm
Estilbenos	Resveratrol	260 nm	$\lambda_{exc}$ 290 - $\lambda_{emi}$ 350 nm
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido <i>p</i> -Cumárico	320 nm	$\lambda_{exc}$ 340 - $\lambda_{emi}$ 420 nm
Flavonas	Hesperidina	280 nm	--
Dihidrochalconas	Floridzina	280 nm	--
Flavonoles	Quercetin 3-O-glucosido	360 nm	--
Antocianos	Pelargonidina 3-O-glucosido	520 nm	--

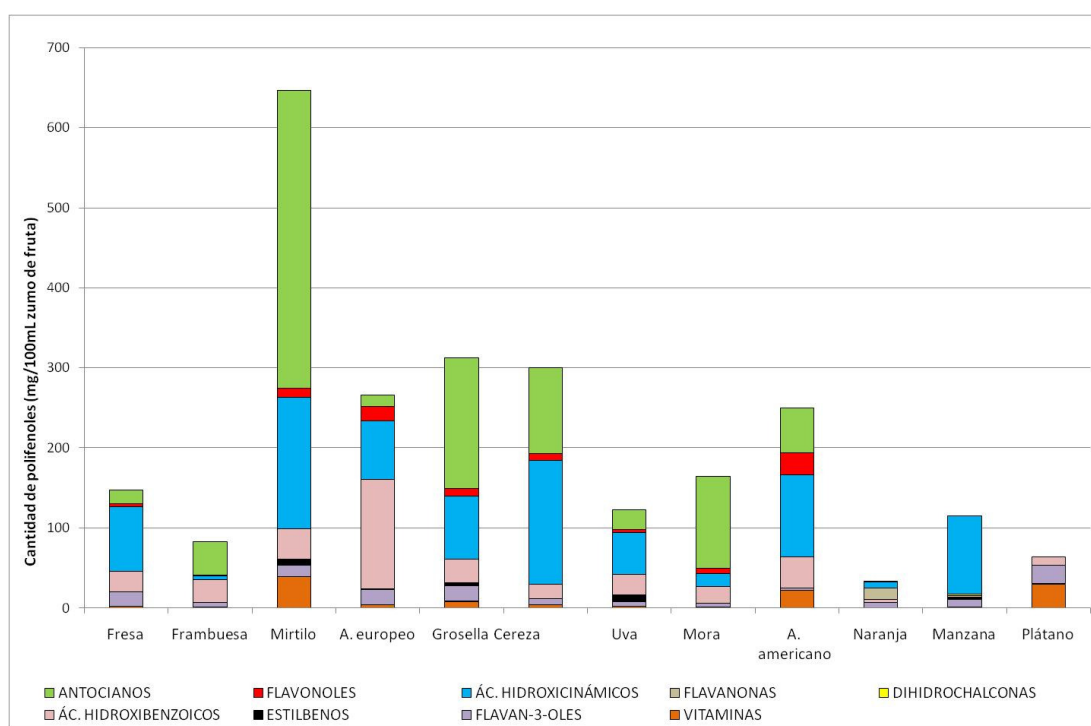
El polifenol estándar para la cuantificación por la UHPLC-PDA-Fluorescencia de los antocianos fue la pelargonidina 3-O-glucósido porque es el mismo patrón estándar que emplea el método IFU nº 71. El patrón estándar para los flavonoles fue quercetin 3-O-glucósido debido a que está presente en la gran mayoría de las frutas estudiadas según indica la bibliografía. En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos se seleccionó el ácido *p*-Cumárico porque está presente en varias de las frutas estudiadas según la bibliografía. La flavanona elegida fue la hesperidina debido a que es el compuesto mayoritario presente en la naranja; mientras que para las dihidrochalconas se seleccionó la floridzina ya que es el compuesto mayoritario de la manzana. Para el grupo de los ácidos hidroxibenzoicos se seleccionó el ácido gálico debido a que es el mismo compuesto que se emplea como referencia en el método de Folin-Ciocalteu y que se utiliza más adelante. En cuanto al flavan-3-ol monomérico se eligió la (+)-catequina por ser el compuesto mayoritario en las frutas; y como estilbeno estándar se eligió el resveratrol porque su presencia en la uva tinta es mayoritaria. También se analizó el ácido ascórbico como patrón estándar para la cuantificación de esta vitamina en las frutas de estudio.

Se prepararon las muestras de patrones estándar a una concentración de 200 mg/L, y se analizaron con las condiciones de detección que se muestran en la Tabla 4.94. Destacar que todos los grupos de polifenoles se detectaron por absorbancia y, además, algunos de ellos como son los ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos también se detectaron por fluorescencia ya que poseen esta característica.

La cuantificación de los polifenoles identificados en cada zumo de fruta se muestra en las Tablas 4.95 a 4.98. Los cálculos se realizaron por grupos de polifenoles referidos a un patrón estándar que fue seleccionado para cada grupo y que se muestra en la Tabla 4.94.

Los cálculos de los Polifenoles Totales Individuales (TIP) se realizaron de la siguiente manera: dentro de cada grupo de polifenoles se cuantificaron las áreas de cada pico identificado refiriéndolo al polifenol estándar correspondiente para obtener la cantidad de ese compuesto expresada en mg/100 mL de zumo.

La Figura 4.66 muestra la cantidad de polifenoles presente en cada una de las frutas estudiadas.



**Figura 4.66:** Distribución de los diferentes grupos de polifenoles por frutas.

**Tabla 4.95:** Cuantificación de los polifenoles individuales de las frutas de: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo, grosella negra y cereza.

Compuesto	Tiempo (minutos)		Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza
	Tr	Tr / 12,9						
mg/100mL zumo de fruta								
VITAMINAS								
Ácido ascórbico	1,03	0,08	2,018	1,112	39,096	4,216	8,277	4,195
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS								
Ácido gálico	2,20	0,17	6,353	5,975	16,643	14,606	9,966	6,452
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,85	0,30	3,204	6,150	19,496	27,541	2,925	6,494
Ácido 4 hidroxibenzoico	4,33	0,34	7,212	1,722				
Ácido vanílico	7,31	0,57			1,714	46,808		5,858
Ácido siríngico	9,95	0,77	3,792	3,532	0,363	11,758	0,363	
Ácido elágico 3-arabinósido	12,80	0,99		3,987				
Ácido elágico	14,10	1,09	5,334	7,463		36,495	15,947	
TOTAL:			25,895	28,829	38,216	137,208	29,201	18,804
FLAVANOLES MONOMÉRICOS								
(-)-Epigallocatequina	3,50	0,27	0,616					
(+)-Catequina	5,60	0,43	6,562	4,094	12,809	10,367	2,243	2,093
(-)-Epigallocatequina galato	8,04	0,62						
(-)-Epicatequina	10,41	0,81	10,874	1,161	1,692	7,765	17,076	4,764
TOTAL:			18,052	5,255	14,501	18,132	19,319	6,857
ESTILBENOS								
Resveratrol 3-O-glucósido	16,52	1,28			6,858		4,027	
Resveratrol	20,60	1,60				1,425		
TOTAL:			--	--	6,858	1,425	4,027	--
DIHIDROCHALCONAS								
Floretina 2'O xilosil-rutinósido	21,57	1,69						
Floridzina	24,06	1,87						
TOTAL:			--	--	--	--	--	--
FLAVANONAS								
Narirutin	16,85	1,31						
Naringin	18,07	1,40						
Hesperidina	21,80	1,69						
Didimin	24,97	1,94						
TOTAL:			--	--	--	--	--	--
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS								
Ácido cafeico 4-O-quinico	4,12	0,32					30,887	7,523
Ácido neoclorogénico	4,64	0,36						101,175
Ácido cafeico 4-O-tartárico	4,85	0,38						
Ácido caftárico	5,34	0,41						
Ácido cafeico 4-O-glucósido	5,51	0,43			40,371	2,064		
Ácido p-Cumárico 3-O-glucósido	5,75	0,45	64,238	1,983	7,568			
Ácido p-Cumárico 3-O-quinico	5,79	0,45					18,094	0,512
Ácido cafeico	6,90	0,53	7,535	0,755	9,973	1,747	7,554	7,757
Ácido p-Cumárico 3-O-tartárico	7,51	0,58						
Ácido clorogénico	7,78	0,60	3,441	1,880	97,717	43,503		35,863
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	8,01	0,62				2,218	21,804	
Ácido p-Cumárico	10,69	0,83	4,459			2,357		
Ácido ferúlico	11,56	0,90			8,439	11,345		1,670
Ácido sinápico	13,24	1,03			0,489	4,737		
Ácido cinámico	20,50	1,59	0,513			4,829		
TOTAL:			80,186	4,618	164,557	72,800	78,339	153,988

**Tabla 4.96:** Cuantificación de los polifenoles individuales de las frutas de: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo, grosella negra y cereza.

Compuesto	Tiempo (minutos)		Fresa	Frambuesa	Mirtilo	Arándano europeo	Grosella negra	Cereza
	Tr	Tr / 12,9						
mg/100mL zumo de fruta								
FLAVONOLES								
Quercetin 3-O-glucosil-rutinósido	11,01	0,85						2,138
Miricetin 3-O-arabinósido	11,72	0,91			1,009			
Miricetin 3-O-rutinósido	13,23	1,03	1,029	0,306			5,773	
Quercetin 3-O-rutinósido	13,95	1,08	0,441	0,730				3,818
Quercetin 3-arabinósido	14,49	1,12			0,925			
Quercetin 3-O-glucósido	14,84	1,15	1,364				2,524	
Quercetin 3-O-galactósido	15,10	1,17			4,529			
Quercetin 3-O-glucurónido	15,50	1,20	0,438		3,803			
Quercetin 3-O-glucopiranosido	16,70	1,29				5,001		
Isorhamnetin 3-O-rutinósido	17,78	1,38				1,399		
Kaempferol 3-O-glucósido	17,95	1,39	0,451			0,601	1,375	
Isorhamnetin 7-O-rutinósido	18,13	1,41						
Isorhamnetin 3-O-glucósido	19,24	1,49						
Quercetin 3-O-rhamnosido	19,52	1,51				8,573		
Kaempferol 3-O-rutinósido	19,85	1,54			0,722	0,728		0,912
Myricetin 3-O-glucósido	20,38	1,58				1,673	0,596	1,796
TOTAL:			3,723	1,036	10,988	17,975	10,268	8,664
ANTOCIANOS								
Dephinidin 3-O-galactósido	8,07	0,63			34,261	0,266		
Delphinidin 3-O-glucósido	8,85	0,69			57,410	0,266	19,334	
Cyanidin 3-O-sophorosido	9,89	0,77		33,174				2,873
Cyanidin 3-O-glucosil-rutinósido	9,96	0,77		0,714				73,670
Delphinidin 3-O-arabinósido	10,14	0,79			30,658			
Cianidin 3-O-glucósido	10,85	0,84	0,266	5,309	48,649	1,387	4,855	1,591
Cianidin 3-O-galactósido	10,88	0,84			22,084	11,031		
Petunidin 3-O-galactósido	10,98	0,85			12,619			
Delphinidina 3-O-rutinósido	11,10	0,86					89,755	
Pelargonidin 3-O-sophorósido	11,80	0,91		0,226				
Petunidin 3-O-glucósido	12,11	0,94			18,662			
Pelargonidin 3-O-glucósido	12,90	1,00	15,131	0,266				
Peonidin 3-O-galactósido	13,01	1,01			3,757			
Cianidin 3-O-rutinósido	13,24	1,03		2,265			46,758	28,051
Pelargonidin 3-O-rutinósido	13,27	1,03	1,680					
Cianidin 3-O-arabinósido	13,92	1,08			41,050	1,461		
Peonidin 3-O-glucósido	14,03	1,09			19,361			
Malvidin 3-O-galactósido	14,17	1,10			20,272			
Petunidin 3-O-arabinósido	14,19	1,10			9,939			
Delphinidina	15,00	1,16					2,258	
Malvidin 3-O-glucósido	15,10	1,17			43,389			
Peonidin 3-O-arabinósido	16,03	1,24						
Malvidin 3-O-arabinósido	16,48	1,28			10,093			
Peonidin 3-O-rutinósido	17,14	1,33						1,036
Cianidin 3-O-xilosido	19,80	1,53						
Cianidin 3-O-(6''-malonil-glucósido)	20,10	1,56						
Cianidin 3-O-(6''-diaxalil-glucósido)	20,70	1,60						
Malvidin 3-O-(6''-acetil-glucósido)	21,82	1,69						
Malvidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)	25,26	1,96						
TOTAL:			17,077	41,954	372,204	14,411	162,960	107,221
		Valor TIP	146,951	82,804	646,420	266,167	312,391	299,729

**Tabla 4.97:** Cuantificación de los polifenoles individuales de uva tinta, mora, arándano americano, naranja, manzana y plátano.

Compuesto	Tiempo (minutos)		Uva tinta	Mora	Arándano americano	Naranja	Manzana	Plátano
	Tr	Tr / 12,9	mg/100mL zumo de fruta					
VITAMINAS								
Ácido ascórbico	1,03	0,08	1,991	1,385	21,913	0,391	0,678	30,245
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS								
Ácido gálico	2,20	0,17	9,126	6,942		3,620		3,919
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,85	0,30	5,987	4,644	4,814			
Ácido 4 hidroxibenzoico	4,33	0,34	4,086					
Ácido vaníliclo	7,31	0,57	4,177		33,176			
Ácido siríntrico	9,95	0,77	2,705				1,964	
Ácido elátrico 3-arabinósido	12,80	0,99						
Ácido elátrico	14,10	1,09		9,013	0,779			6,387
TOTAL:			26,081	20,599	38,769	3,620	1,964	10,306
FLAVANOLES MONOMÉRICOS								
(-)-Epigallocatequina	3,50	0,27	0,633	1,687	1,194	0,241	0,648	
(+)-Catequina	5,60	0,43	3,965	2,812		4,012	1,145	19,402
(-)-Epigallocatequina galato	8,04	0,62	0,652				2,611	
(-)-Epicatequina	10,41	0,81	0,526		1,746	2,423	5,181	3,416
TOTAL:			5,776	4,499	2,940	6,676	9,585	22,818
ESTILBENOS								
Resveratrol 3-O-glucósido	16,52	1,28	2,301				2,017	
Resveratrol	20,60	1,60	5,761				0,856	
TOTAL:			8,062	--	--	--	2,873	--
DIHIDROCHALCONAS								
Phloretin 2`O xilosil-rutinósido	21,57	1,69					0,902	
Phloritzina	24,06	1,87					1,349	
TOTAL:			--	--	--	--	2,251	--
FLAVANONAS								
Narirutin	16,85	1,31				5,904		
Naringin	18,07	1,40				0,397		
Hesperidina	21,80	1,69				6,679		
Didimin	24,97	1,94				0,641		
TOTAL:			--	--	--	13,621	--	--
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS								
Ácido cafeico 4-O-quinico	4,12	0,32		7,816				
Ácido neoclorogénico	4,64	0,36						
Ácido cafeico 4-O-tartátrico	4,85	0,38	0,400					
Ácido caftátrico	5,34	0,41	20,941					
Ácido cafeico 4-O-glucósido	5,51	0,43			2,151			
Ácido p-Cumátrico 3-O-glucósido	5,75	0,45			79,305	1,494	16,123	
Ácido p-Cumátrico 3-O-quinico	5,79	0,45		8,289				
Ácido cafeico	6,90	0,53	3,442		6,086	1,443	3,416	
Ácido p-Cumátrico 3-O-tartátrico	7,51	0,58	19,852					
Ácido clorogénico	7,78	0,60	6,556		0,489	4,507	77,928	
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	8,01	0,62			3,318	0,948		
Ácido p-Cumátrico	10,69	0,83	0,489					
Ácido ferúlico	11,56	0,90			10,718			
Ácido sinápico	13,24	1,03						
Ácido cinámico	20,50	1,59			0,489			
TOTAL:			51,680	16,105	102,556	8,392	97,467	--

**Tabla 4.98:** Cuantificación de los polifenoles individuales de uva tinta, mora, arándano americano, naranja, manzana y plátano.

Compuesto	Tiempo (minutos)		Uva tinta	Mora	Arándano americano	Naranja	Manzana	Plátano
	Tr	Tr / 12,9						
mg/100mL zumo de fruta								
FLAVONOLES								
Quercetin 3-O-glucosil-rutinósido	11,01	0,85						
Miricetin 3-O-arabinósido	11,72	0,91	1,616	0,865	5,740			
Miricetin 3-O-rutinósido	13,23	1,03						
Quercetin 3-O-rutinósido	13,95	1,08	0,154					
Quercetin 3-arabinósido	14,49	1,12						
Quercetin 3-O-glucósido	14,84	1,15						
Quercetin 3-O-galactósido	15,10	1,17		3,759	15,857			
Quercetin 3-O-glucurónido	15,50	1,20	2,234					
Quercetin 3-O-glucopiranosido	16,70	1,29						
Isorhamnetin 3-O-rutinósido	17,78	1,38		0,572	1,227			
Kaempferol 3-O-glucósido	17,95	1,39		0,682	2,920			
Isorhamnetin 7-O-rutinósido	18,13	1,41				0,329		
Isorhamnetin 3-O-glucósido	19,24	1,49	0,202					
Quercetin 3-O-rhamnosido	19,52	1,51		1,149	2,032			
Kaempferol 3-O-rutinósido	19,85	1,54						
Myricetin 3-O-glucósido	20,38	1,58						
TOTAL:			4,206	7,027	27,776	0,329	--	--
ANTOCIANOS								
Dephinidin 3-O-galactósido	8,07	0,63						
Delphinidin 3-O-glucósido	8,85	0,69	3,424					
Cyanidin 3-O-sophorosido	9,89	0,77						
Cyanidin 3-O-glucosil-rutinósido	9,96	0,77						
Delphinidin 3-O-arabinósido	10,14	0,79						
Cianidin 3-O-glucósido	10,85	0,84	1,141	95,956				
Cianidin 3-O-galactósido	10,88	0,84			10,908			
Petunidin 3-O-galactósido	10,98	0,85						
Delphinidina 3-O-rutinósido	11,10	0,86						
Pelargonidin 3-O-sophorósido	11,80	0,91						
Petunidin 3-O-glucósido	12,11	0,94	3,033					
Pelargonidin 3-O-glucósido	12,90	1,00						
Peonidin 3-O-galactósido	13,01	1,01			13,411			
Cianidin 3-O-rutinósido	13,24	1,03		4,511				
Pelargonidin 3-O-rutinósido	13,27	1,03						
Cianidin 3-O-arabinósido	13,92	1,08			1,823			
Peonidin 3-O-glucósido	14,03	1,09	2,372		20,403			
Malvidin 3-O-galactósido	14,17	1,10						
Petunidin 3-O-arabinósido	14,19	1,10						
Delphinidina	15,00	1,16						
Malvidin 3-O-glucósido	15,10	1,17	12,412					
Peonidin 3-O-arabinósido	16,03	1,24			9,372			
Malvidin 3-O-arabinósido	16,48	1,28						
Peonidin 3-O-rutinósido	17,14	1,33						
Cianidin 3-O-xilosido	19,80	1,53		2,985				
Cianidin 3-O-(6''-malonil-glucósido)	20,10	1,56		0,650				
Cianidin 3-O-(6''-diaxalil-glucósido)	20,70	1,60		10,869				
Malvidin 3-O-(6"-acetil-glucósido)	21,82	1,69	1,097					
Malvidin 3-O-(6"-p-Cumaroil-glucósido)	25,26	1,96	1,597					
TOTAL:			25,076	114,971	55,917	--	--	--
Valor TIP			122,872	164,586	249,871	33,029	114,818	63,369

Comparando los resultados obtenidos de las Tablas 4.95, 4.96, 4.97 y 4.98 observamos como la fruta con mayor cantidad de ácidos hidroxibenzoicos es el arándano europeo con una cantidad de 137,208 mg/100 mL, seguido del arándano americano con 38,769 mg/100 mL y del mirtilo con 38,216 mg/100 mL. Cabe destacar la elevada presencia de ácido vanílico en los arándanos europeo y americano con unas cantidades de 46,808 mg/100 mL y 33,176 mg/100 mL respectivamente. Esta elevada cantidad indica que la presencia de este ácido hidroxibenzoico en dichas frutas es característica y nos ayudaría en la identificación en el caso de tener que tratar una mezcla de frutas.

En cuanto a la cantidad de flavan-3-oles monoméricos, cabe destacar el plátano con 22,818 mg/100 mL y la grosella negra con 19,319 mg/100 mL, seguida de la fresa y el arándano europeo con valores de 18,052 y 18,132 mg/100 mL respectivamente. También indicar que el flavonol monomérico mayoritario de las frutas estudiadas es la (-)-epicatequina presente en la grosella negra con la mayor cantidad (17,076 mg/100 mL); la presencia de (+)-catequina en el mirtilo es también característica con 12,809 mg/100 mL.

La presencia de estilbenos en las frutas rojas estudiadas es bastante elevada en la uva tinta con 8,062 mg/100 mL, mirtilo 6,858 mg/100 mL y grosella negra con 4,027 mg/100 mL.

Los ácidos hidroxicinámicos destacan en el mirtilo con 164,557 mg/100 mL, la cereza (153,988 mg/100 mL) y el arándano americano (102,556 mg/100 mL). Sin embargo, la presencia de estos ácidos en la frambuesa es baja con un valor de 4,618 mg/100 mL. Individualmente se aprecia la elevada presencia de ácido neoclorogénico en la cereza con 101,175 mg/100 mL, y el ácido clorogénico destaca su presencia en el mirtilo con un valor de 97,717 mg/100 mL.

De la cantidad de flavonoles presentes en las frutas destaca el arándano americano con un valor de 27,776 mg/100 mL seguido del arándano europeo (17,975 mg/100 mL) y el mirtilo (10,988 mg/100 mL). Con respecto al volumen de flavonoles, quercetin 3-O-galactosido con 15,857 mg/100 mL es el valor más alto obtenido en todas las frutas y corresponde al arándano americano. Otro flavonol destacable es el quercetin 3-O-rhamnosido con 8,573 mg/100 mL presente en el arándano europeo.



En cuanto a la presencia de antocianos, el mirtilo tiene la cantidad más alta con un valor de 372,204 mg/100 mL seguido de la grosella (162,960 mg/100 mL) y la mora (114,971 mg/100 mL). La fruta con menor cantidad de antocianos es el arándano europeo (14,411 mg/100 mL) y la fresa (17,077 mg/100 mL). De manera individual cabe destacar la presencia de cianidin 3-O-glucósido en la mora con un elevado valor de 95,956 mg/100 mL. Otros antocianos característicos de las frutas estudiadas son la delfinidina 3-O-rutinósido presente en la grosella negra (89,755 mg/100 mL) y cianidin 3-O-glucosil-rutinósido presente en la cereza con 73,670 mg/100 mL.

La naranja es la única fruta con presencia de flavanonas con una cantidad total de 13,621 mg/100 mL. Destaca la cantidad de hesperidina y narirutina con valores de 6,679 y 5,904 mg/100 mL respectivamente.

La manzana es la única fruta estudiada donde se presentan las dihidrochalconas con un valor de 2,251 mg/100 mL destacando la presencia de floridzina con 1,349 mg/100 mL.

Estas Tablas 4.95, 4.96, 4.97 y 4.98, confeccionadas con los resultados obtenidos en nuestra investigación, son de gran utilidad para los fabricantes de zumos y bebidas de frutas ya que constituyen una base de datos que puede actuar como “huella dactilar” para determinar la presencia o no de una fruta en una mezcla de frutas.

#### **4.4.2.- Determinación de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu**

Algunos países tienen establecido en su normativa que el etiquetado de sus productos ha de indicar la cantidad de fenoles totales aunque en España aún no es obligatorio. Estos fenoles totales se suelen determinar por métodos colorimétricos, entre ellos, el que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu es de los más utilizados.

Para comparar la determinación de los fenoles totales individuales (TIP) con la de fenoles totales (TP) se determinaron los polifenoles totales en los zumos estudiados por el método de Folin-Ciocalteu según el método propuesto por Skerget *et al.*, 2005.

El método de Folin-Ciocalteu, explicado en el Capítulo 3 de materiales y métodos, es un método sencillo y rápido para determinar los polifenoles totales de la muestra de zumo analizada. El principal inconveniente que este método presenta es que detecta compuestos antioxidantes en general y no diferencia ciertos compuestos como es el caso de la vitamina C y la cuantifica como si se tratase de un polifenol. Para evitar este error en la cuantificación, a los valores de TP obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu se le resta el valor de ácido ascórbico obtenido por UHPLC a una absorbancia de 243 nm y a un tiempo de 1,048 minutos tal y como se muestra en las Tablas 4.94 al 4.97.

Los resultados obtenidos de analizar los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, están recogidos en la Tabla 4.99 donde los resultados se expresan como mg GAE (Equivalentes de Ácido Gálico) por 100 mL de zumo. También están recogidos los valores de ácido ascórbico de cada una de las frutas estudiadas. La diferencia entre ambos valores nos indica el valor total de polifenoles de las muestras.

**Tabla 4.99:** Cuantificación de la cantidad total de polifenoles en las frutas de estudio por el método de Folin-Ciocalteu y su rectificación sin el ácido ascórbico.

	Método de Folin-Ciocalteu (mg GAE/100mL zumo)	Ácido ascórbico (mg/100mL zumo)	Polifenoles Totales (TP)
<b>Fresa</b>	142,63	2,02	<b>140,61</b>
<b>Frambuesa</b>	102,52	1,11	<b>101,41</b>
<b>Mirtilo</b>	423,60	39,10	<b>384,50</b>
<b>Arándano europeo</b>	246,18	4,22	<b>241,96</b>
<b>Grosella negra</b>	283,56	8,28	<b>275,28</b>
<b>Cereza</b>	248,92	4,20	<b>244,73</b>
<b>Uva tinta</b>	169,47	1,99	<b>167,48</b>
<b>Mora</b>	196,32	1,39	<b>194,94</b>
<b>Arándano americano</b>	214,45	21,91	<b>192,54</b>
<b>Naranja</b>	84,45	0,39	<b>84,06</b>
<b>Manzana</b>	114,89	0,68	<b>114,21</b>
<b>Plátano</b>	105,14	30,25	<b>74,90</b>

Podemos observar como el mayor contenido en polifenoles según el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu está en la fruta del mirtilo con un valor de 423,6 mg/100 mL seguido por la grosella negra, cereza y arándano europeo con 283,56 / 248,92 y 246,18 mg/100 mL de zumo respectivamente.

Las frutas con menor cantidad de polifenoles totales son la naranja y el plátano con 84,45 y 105,14 mg/100 mL.

En cuanto a la cantidad de ácido ascórbico presente en las frutas, cuyos valores se obtuvieron en el análisis por UHPLC, destaca el mirtilo, el arándano americano y el plátano con 39,10; 21,91 y 30,25 mg/100 mL respectivamente. El resto de frutas analizadas muestra valores inferiores, entre los 0,39 mg/100 mL de la naranja y los 8,28 mg/100 mL de la grosella negra.

#### 4.4.3.- Correlación de los valores obtenidos con UHPLC y el método de Folin-Ciocalteu (TP *versus* TIP) para la determinación de los polifenoles totales de las frutas

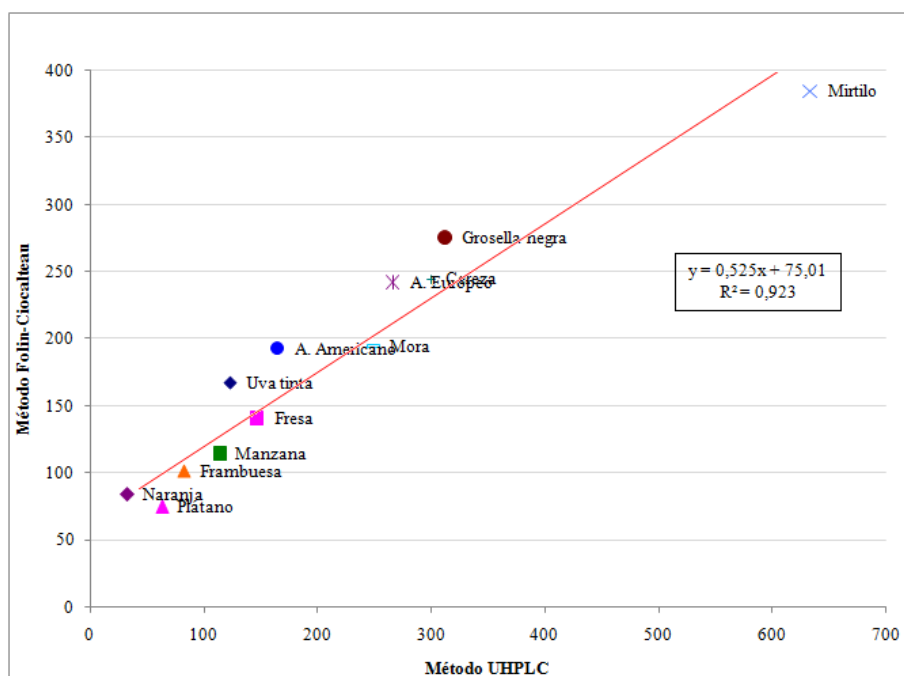
Tras determinar la cuantificación de los polifenoles totales presentes en las frutas de estudio por el método de UHPLC-PDA-Fluorescencia (TIP) y el método de Folin-Ciocalteu (TP), pasamos a correlacionar los valores para obtener una relación entre ellos que nos ayude a determinar aproximadamente el valor de cualquier otra fruta de estudio en base a la cantidad de polifenoles presentes en ella.

La Tabla 4.100 muestra el resumen de los valores obtenidos con ambos métodos (TIP y TP), y en la Figura 4.67 se muestra la gráfica que indica su correlación.

**Tabla 4.100:** Valores de polifenoles totales de las frutas de estudio determinados por el método de UHPLC-PDA-Fluo (TIP) y por el método de Folin-Ciocalteu (TP).

	Valor TIP	Valor TP
	mg/100mL zumo de fruta	
<b>Fresa</b>	146,951	140,612
<b>Frambuesa</b>	82,804	101,408
<b>Mirtilo</b>	646,42	384,504
<b>Arándano europeo</b>	266,167	241,964
<b>Grosella negra</b>	312,391	275,283
<b>Cereza</b>	299,729	244,725
<b>Uva tinta</b>	122,872	167,479
<b>Mora</b>	164,586	194,935
<b>Arándano americano</b>	249,871	192,537
<b>Naranja</b>	33,029	84,059
<b>Manzana</b>	114,818	114,212
<b>Plátano</b>	63,369	74,895

La relación entre el método colorimétrico de Folin Ciocalteu (TP) y el método de UHPLC-PDA-Fluorescencia (TIP) de cuantificación de los polifenoles totales se muestra en la Figura 4.67 y el valor de  $R^2$  obtenido es de 0,923.



**Figura 4.67:** Correlación entre el método de Folin-Ciocalteu y el método UHPLC.

Los análisis de zumos para determinar la cantidad de fenoles totales pueden realizarse por los dos métodos estudiados aunque se recomienda el método de UHPLC que es más específico, fiable y aporta una mayor información que el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu en el que la información que nos proporcionan sus resultados es escasa y menos precisa.

#### 4.5.- “Análisis y cuantificación de fenoles totales en bebidas de frutas comerciales”

Tras analizar individualmente las frutas que la industria de zumos emplea en la elaboración de las bebidas, se estudiaron diferentes bebidas comerciales, cuatro zumos antiOx y tres smoothies pertenecientes a distintas casas comerciales. La composición principal de todos ellos son las frutas rojas.

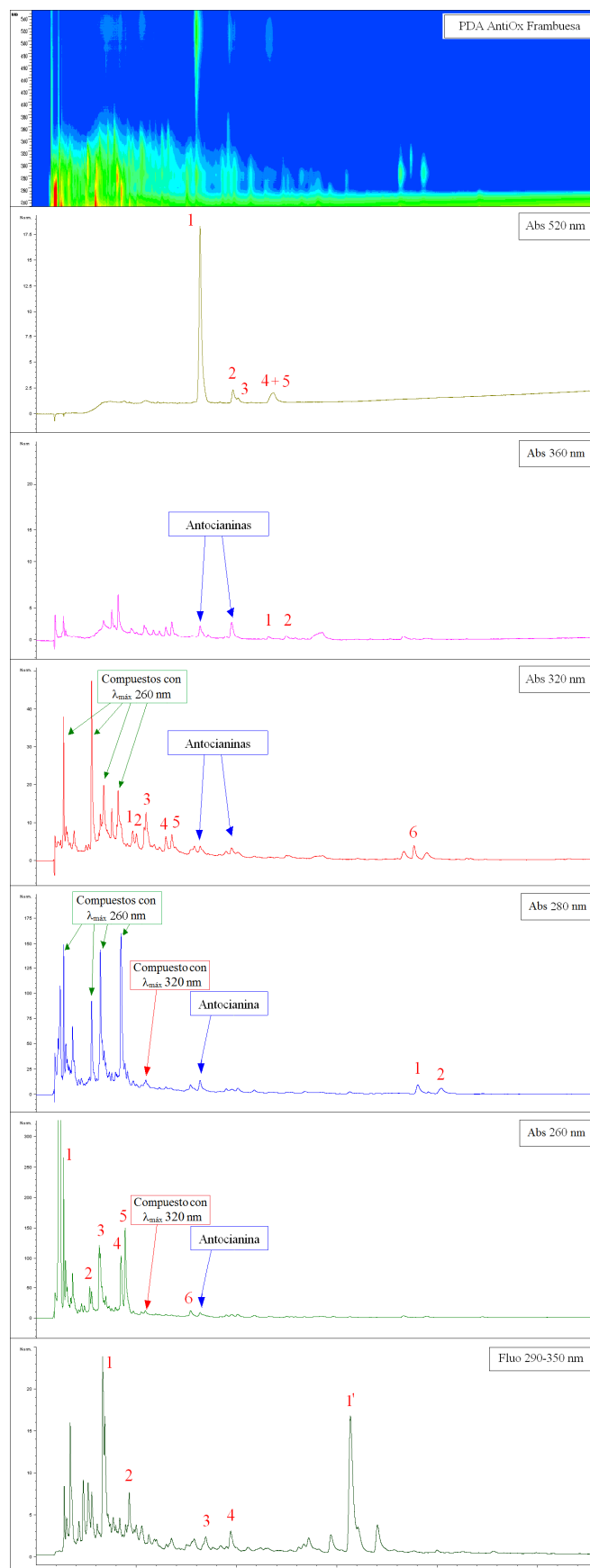
Así, en este apartado final se va a realizar el análisis de distintos productos comerciales, con el método de UHPLC desarrollado. En la identificación de componentes se van a utilizar las Tablas 4.56, 4.57, 4.58, 4.92 y 4.93 de composición de polifenoles en frutas que se han obtenido en los estudios previos. Con ello se comprueba la utilidad del método para determinar la autenticidad en la composición de las frutas de zumos y smoothies comerciales.

##### 4.5.1.- Zumos antioxidantes

###### - Compal Vital AntiOx frambuesa

La muestra analizada es un zumo antioxidante exprimido con 4,9 °Brix procedente de la casa comercial portuguesa Compal Vital. La composición de este zumo según su etiquetado indica que se ha elaborado a base de concentrados: zumo y pulpa de frambuesa (28 %) y manzana (22 %), agua, antioxidante (ácido ascórbico) y edulcorantes (aspartato y acesulfamo k). Además, al tratarse de un zumo comercializado en Portugal, su etiquetado indica que el valor de polifenoles que contiene que es de 70 mg/100 mL.

Se ha realizado el análisis por UHPLC de los distintos grupos de polifenoles para los que se ha desarrollado el método analítico. El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), los perfiles de absorbancia de antocianos a 520 nm, flavonoles a 360 nm, ácidos hidroxicinámicos a 320 nm, flavanonas y dihidrochalconas a 280 nm y ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos a 260 nm y fluorescencia de  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm, se muestran en la Figura 4.68. Además, la Tabla 4.101 recoge la identificación de los picos de absorbancia y fluorescencia obtenidos. Para su identificación se tienen en cuenta los datos de las Tablas 4.56, 4.57 4.58, 4.92 y 4.93.



**Figura 4.68:** Cromatograma general obtenido por PDA, perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y perfil de fluorescencia a 290-350 nm de la muestra de zumo comercial Compal Vital Frambuesa.

Se ha logrado la identificación de los principales polifenoles presentes en este zumo comercial compuesto por frambuesa y manzana. La Tabla 4.101 muestra la numeración establecida en la Figura 4.68, la identificación de los compuestos, su cuantificación y la fruta de la que procede cada compuesto identificado. Para una mayor aclaración de los resultados, la identificación de los compuestos en la Tabla 4.101 muestra las siglas AN para indicar que se trata de un compuesto perteneciente al grupo de los antocianos, FN grupo de flavonoles, HC ácidos hidroxicinámicos, CH dihidrochalconas, HB ácidos hidroxibenzoicos, FL flavan-3-oles monoméricos y ST estilbenos. Además, los compuestos que no se identificaron se marcaron con n.i.

En total se han identificado en este zumo comercial 5 antocianos, 2 flavonoles, 6 ácidos hidroxicinámicos, 2 dihidrochalconas, 6 ácidos hidroxibenzoicos, 4 flavan-3-oles monoméricos y 1 estilbeno.

Los 5 antocianos identificados proceden de la frambuesa ya que es la única de las dos frutas que componen este zumo que posee antocianos. De estos, los compuestos cianidin 3-O-rutinósido y pelargonidin 3-O-glucósido (picos AN-4 y AN-5) aparecen solapados. Al igual que los antocianos, los flavonoles identificados también proceden de la frambuesa. Su identificación fue más complicada debido a la baja concentración en la que aparecen en el zumo.

En el grupo de los ácidos hidroxicinámicos se detectaron 6 compuestos de los cuales 3 no se lograron identificar (picos HC-1, HC-2 y HC-6). De los identificados, el ácido *p*-Cumárico-glucósido procede de la frambuesa y los ácidos cafeico y clorogénico están presentes en frambuesa y manzana. Los valores de concentración de éstos ácidos son bajos cuando se comparan con los otros productos comerciales analizados.

Al contener este zumo manzana, se estudió la presencia de dihidrochalconas y se identificaron dos, floretin 2-O-xilosil-glucósido y floridzina.

Seis fueron los ácidos hidroxibenzoicos detectados en este zumo aunque 2 de ellos están sin identificar. Todos proceden de la frambuesa a excepción del ácido siríngico que está presente en ambas frutas. Destacan por su concentración los ácidos 3,4 dihidroxibenzoico (HB-3) y 4-hidroxibenzoico (HB-4).

Con el perfil de fluorescencia se detectaron 4 flavan-3-oles monoméricos y un estilbeno. Todos están presentes en ambas frutas excepto (-)-epigallocatequina galato que procede de la manzana.

**Tabla 4.101:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el zumo Compal Antiox Frambuesa.

Nº	Identificación del compuesto	Cuantificación (mg/100 mL zumo)	Fruta de la que procede
ANTOCIANOS (Detección: abs 520 nm)			
AN-1	Cianidin 3-O-sophorósido	0,840	Frambuesa
AN-2	Cianidin 3-O-glucósido	0,068	
AN-3	Pelargonidin 3-sophorósido	0,025	
AN-4+5	Cianidin 3-O-rutinósido + Pelargonidin 3-O-glucósido	0,132	
FLAVONOLES (Detección: abs 360 nm)			
FN-1	Miricetin 3-O-rutinósido	0,024	Frambuesa
FN-2	Quercetin 3-O-rutinósido	0,055	
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Detección: abs 320 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 340 y $\lambda_{emi}$ 420 nm)			
HC-1	n.i.	1,898	--
HC-2	n.i.	2,347	--
HC-3	Ácido <i>p</i> -Cumárico glucósido	2,234	Frambuesa y manzana
HC-4	Ácido cafeico	1,066	
HC-5	Ácido clorogénico	0,861	
HC-6	n.i.	0,344	--
DIHIDROCHALCONAS (Detección: abs 280 nm)			
CH-1	Floretin 2' O xilosil-glucósido	0,235	Manzana
CH-2	Floridzina	0,206	
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
HB-1	n.i.	4,056	--
HB-2	Ácido gálico	1,931	Frambuesa
HB-3	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,270	
HB-4	Ácido 4 hidroxibenzoico	4,966	
HB-5	n.i.	2,913	--
HB-6	Ácido siríngico	0,202	Frambuesa y manzana
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
FL-1	(-)-Epigallocatequina	0,301	Manzana
FL-2	(+)-Catequina	0,153	Frambuesa y manzana
FL-3	(-)-Epigallocatequina galato	0,048	Manzana
FL-4	(-)-Epicatequina	0,060	Frambuesa y manzana
ESTILBENOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
ES-1	Resveratrol 3-glucósido	1,055	Manzana
VITAMINA C (Detección: abs 243 nm)			
--	Ácido ascórbico	6,314	--
Total polifenoles individuales (TIP):		29,31	mg/100 mL zumo
Total polifenoles (TP):		74,10	mg GAE/100 mL zumo



No se han detectado compuestos pertenecientes a otras frutas, por lo que se confirma así la autenticidad del zumo cuyas frutas de origen son la frambuesa y la manzana.

Además en la Tabla 4.101 también se recogen los resultados del análisis de los polifenoles individuales (TIP) por UHPLC y de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu.

El valor total de polifenoles individuales (TIP) en este zumo comercial ha sido de 29,31 mg/100 mL zumo, y el valor total de polifenoles (TP) obtenido por el método colorimétrico de 74,10 mg GAE/100 mL zumo. Éste último es próximo al indicado en el etiquetado de 70 mg/100 mL. La diferencia entre los valores de TIP y TP es alta y pone de manifiesto la poca especificidad del método colorimétrico.

Respecto al contenido en vitamina C que este zumo comercial contiene (6,314 mg/100 mL zumo) procede principalmente de la adición de antioxidantes tal y como se indica en el etiquetado. El valor obtenido para este zumo comparando con el de los otros zumos analizados es elevado.

### **- Zumo antioxidante exprimido Eroski**

La muestra analizada es un zumo antioxidante exprimido con 12,4 °Brix procedente de la casa comercial Eroski. La composición según su etiquetado es 73 % zumo de uva roja, 20 % puré de frambuesa y 7 % puré de cereza. Como se trata de un zumo elaborado y comercializado en España su etiquetado no indica la cantidad de polifenoles que contiene.

En el análisis por UHPLC se obtuvo el cromatograma general con el detector de fotodiodos (PDA), los perfiles de absorbancia de los distintos compuestos fenólicos a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y el perfil de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm, todos ellos mostrados en la Figura 4.69. Además, la Tabla 4.102 recoge la identificación de los picos de absorbancia y fluorescencia obtenidos. Para su identificación se tienen en cuenta los datos de las Tablas 4.56, 4.57, 4.58, 4.92 y 4.93.

Se han identificado los principales polifenoles presentes en las frutas que contiene este zumo comercial (uva, frambuesa y cereza). La Tabla 4.102 muestra la numeración establecida en la Figura 4.69, la identificación de los compuestos, su cuantificación y la fruta de la que procede cada compuesto identificado. Para una mayor aclaración de los resultados, la identificación de los compuestos en la Tabla 4.102 muestra diferentes siglas antes del número de identificación para indicar a que grupo polifenólico pertenece ese compuesto.

En total se lograron identificar en este zumo comercial 9 antocianos, 2 flavonoles, 6 ácidos hidroxicinámicos, 6 ácidos hidroxibenzoicos, 3 flavan-3-oles monoméricos y 1 estilbeno.

De los 9 antocianos identificados uno está presente en todas las frutas que contiene la mezcla de zumos y que se corresponde con cianidin 3-O-glucósido (pico AN-4), otros 3 (picos AN-2, AN-3 y AN-6) proceden de la frambuesa y la cereza, y los cinco restantes son exclusivos de la uva tinta.

Solo se detectó la presencia de 2 flavonoles de los cuales uno es característico de la uva tinta (pico FN-1) y el otro lo contienen todas las frutas (pico FN-2) que componen este zumo comercial.

En el grupo de los ácidos hidroxicinámicos se detectaron 6 compuestos. Los ácidos neoclorogénico y *p*-Cumaroil-quinico (picos HC-1 y HC-3) son característicos de la cereza, mientras que los ácidos caféico y *p*-Cumaroil-tartárico están presentes en la uva tinta. El resto de compuestos de este grupo está presente en todas las frutas.

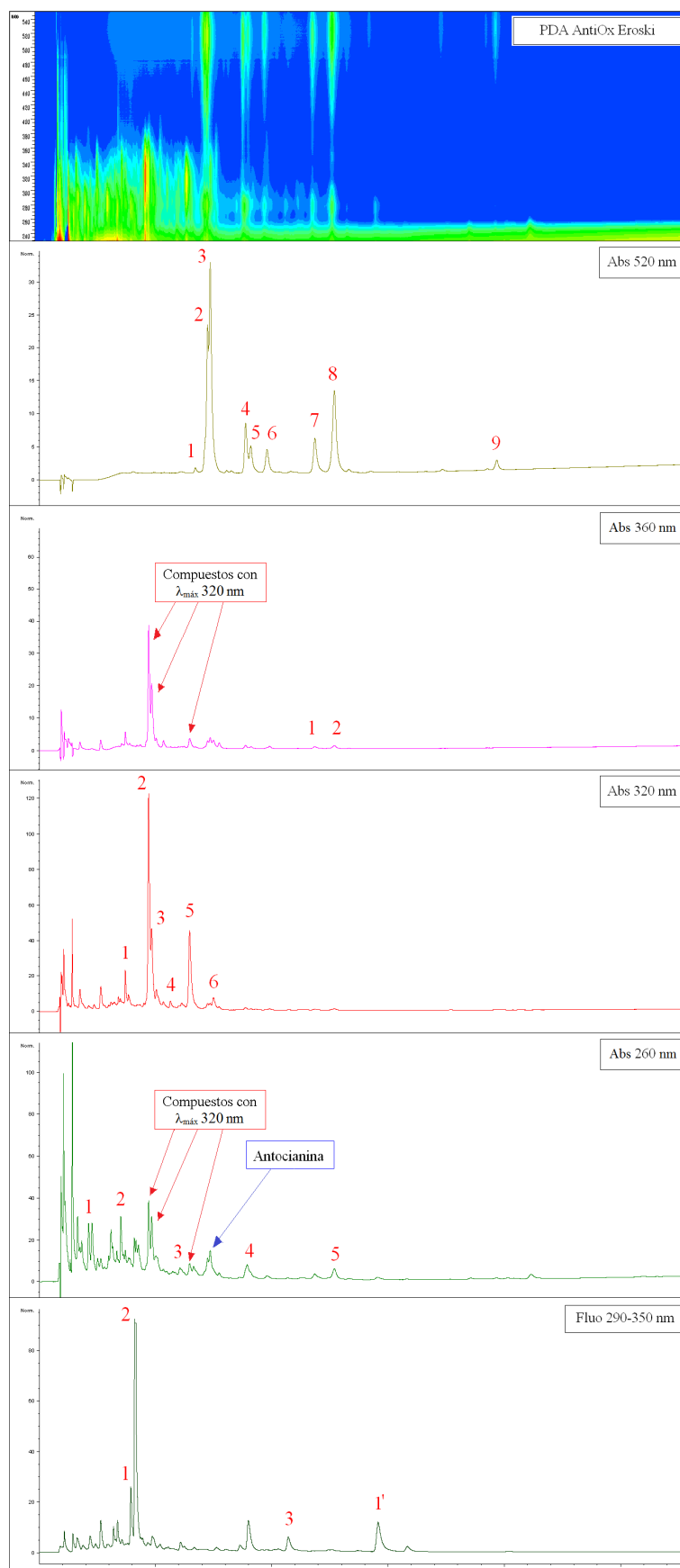
Se identificaron 6 ácidos hidroxibenzoicos procedentes de las frutas que componen el zumo analizado, destacando el ácido elágico 3-arabinósido (pico HB-6) que es característico de la frambuesa y que el resto de frutas no presenta.

Los tres flavan-3-oles monoméricos identificados son (-)-epigallocatequina (FL-1) característico de la uva tinta, (+) catequina (FL-2) y (-)-epicatequina (FL-3) presentes en todas las frutas que componen el zumo. También se encontró el estilbeno resveratrol 3-glucósido (ES-1) procedente de la uva tinta.

Los valores obtenidos de polifenoles totales individuales (TIP) y polifenoles totales (TP) están recogidos en la Tabla 4.102.

No se han detectado compuestos pertenecientes a otras frutas, por lo que se confirma así la autenticidad del zumo según lo que indica su etiqueta.

El valor total de polifenoles individuales (TIP) obtenido ha sido de 43,09 mg/100 mL zumo, y el valor total de polifenoles (TP) de 95,12 mg GAE/100 mL zumo. La diferencia entre ambos valores es significativa y probablemente el elevado valor de TP sea debido a que el método de Folin-Ciocalteu detecta, además de los polifenoles, otras sustancias reductoras o proteínas solubles.



**Figura 4.69:** Cromatograma general obtenido por PDA, perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y perfil de fluorescencia a 290-350 nm de la muestra de zumo comercial Antioxidante exprimido Eroski.

**Tabla 4.102:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el zumo Antioxidante Eroski.

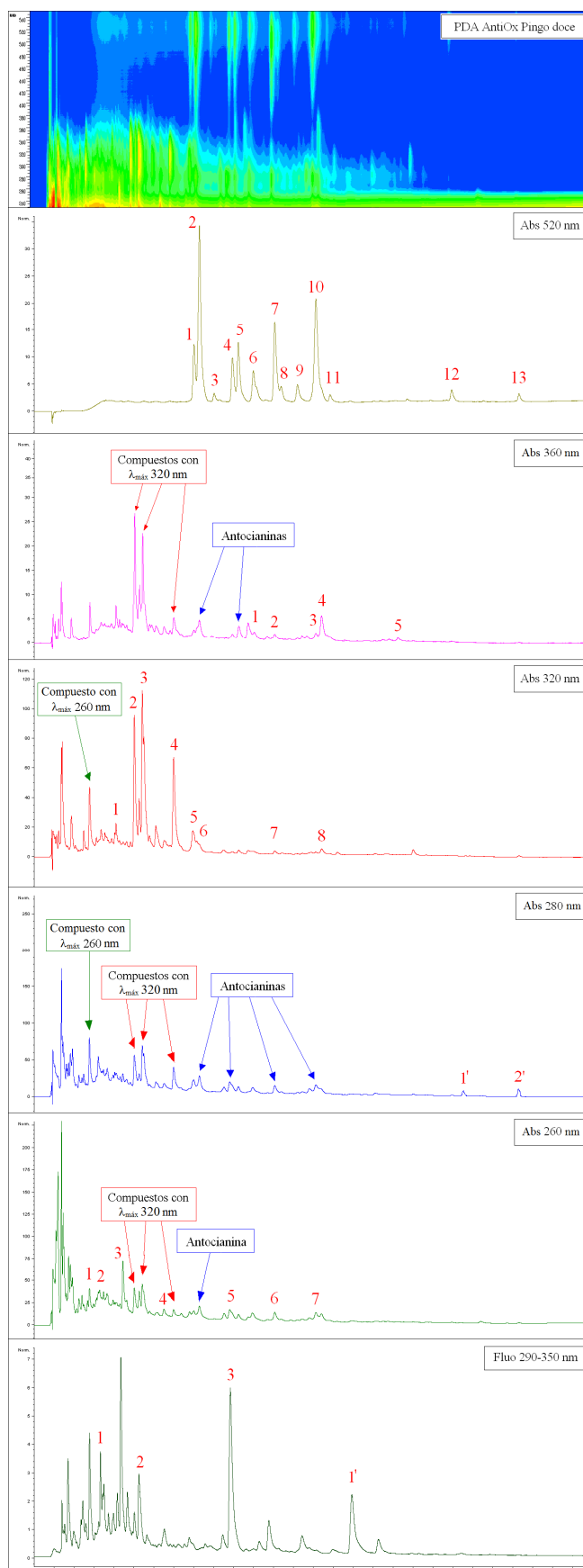
Nº	Identificación del compuesto	Cuantificación (mg/100 mL zumo)	Fruta de la que procede
ANTOCIANOS (Detección: abs 520 nm)			
AN-1	Delphinidin 3-O-glucósido	0,053	Uva tinta
AN-2	Cianidin 3-O-sophorósido	0,771	Frambuesa y cereza
AN-3	Cianidin 3-O-glucosil-rutinósido	1,373	Frambuesa y cereza
AN-4	Cianidin 3-O-glucósido	0,324	Todas
AN-5	Petunidin 3-O-glucósido	0,196	Uva tinta
AN-6	Cianidin 3-O-rutinósido	0,184	Frambuesa y cereza
AN-7	Peonidin 3-O-glucósido	0,289	Uva tinta
AN-8	Malvidin 3-O-glucósido	0,808	Uva tinta
AN-9	Malvidin 3-O-(6''-p-Cumaroyl-glucósido)	0,071	Uva tinta
FLAVONOLES (Detección: abs 360 nm)			
FN-1	Miricetin 3-O-arabinósido	0,030	Uva tinta
FN-2	Quercetin 3-O-rutinósido	0,031	Todas
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Detección: abs 320 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 340 y $\lambda_{emi}$ 420 nm)			
HC-1	Ácido neoclorogénico	0,428	Cereza
HC-2	Ácido caftárico	8,760	Uva tinta
HC-3	Ácido <i>p</i> -Cumaroil-quínico	4,512	Cereza
HC-4	Ácido cafeico	2,772	Todas
HC-5	Ácido <i>p</i> -Cumaroil-tartárico	6,311	Uva tinta
HC-6	Ácido clorogénico	0,980	Todas
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
HB-1	Ácido gálico	3,144	Todas
HB-2	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	2,459	Todas
HB-3	Ácido 4 hidroxibenzoico	3,261	Frambuesa y uva tinta
HB-4	Ácido vanílico	1,979	Cereza y uva tinta
HB-5	Ácido sirínico	0,699	Frambuesa y uva tinta
HB-6	Ácido elágico 3-arabinósido	0,363	Frambuesa
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
FL-1	(-)-Epigallocatequina	0,363	Uva tinta
FL-2	(+)-Catequina	1,659	Todas
FL-3	(-)-Epicatequina	0,149	
ESTILBENOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
ES-1	Resveratrol 3-glucósido	0,787	Uva tinta
VITAMINA C (Detección: abs 243 nm)			
--	Ácido ascórbico	3,554	--
Total polifenoles individuales (TIP):		43,09	mg/100 mL zumo
Total polifenoles (TP):		95,12	mg GAE/100 mL zumo

**- “Antiox sumo de Frutos Vermelhos” Pingo doce**

La muestra analizada es un zumo antioxidante exprimido con 12,6 °Brix procedente de la casa comercial J. García Carrión bajo la marca Pingo doce. Se trata de un zumo elaborado en España y comercializado en otro país, en este caso Portugal, por lo que su etiquetado indica que el contenido en polifenoles es de 83 mg/100 mL. La composición de este zumo según etiquetado indica que se trata de un zumo de frutos a base de concentrado (80 %) compuesto por: manzana, uva, fresa, frambuesa, arándano y grosella. Además se añadieron antioxidantes (ácido ascórbico), agua y aromas.

En el análisis por UHPLC se obtuvo el cromatograma general con el detector de fotodiodos (PDA), los perfiles de absorbancia de los distintos compuestos fenólicos y el perfil de fluorescencia, todos ellos mostrados en la Figura 4.70. Además, las Tablas 4.103 y 4.104 recogen la identificación de los picos de absorbancia y fluorescencia obtenidos. Para su identificación se tienen en cuenta los datos de las Tablas 4.56, 4.57, 4.58, 4.92 y 4.93.

Se han identificado los principales polifenoles presentes en este zumo comercial. Las Tablas 4.103 y 4.104 muestran la numeración de la Figura 4.70, la identificación de los compuestos, su cuantificación y la fruta de la que procede cada compuesto identificado. En total fueron 13 antocianos, 5 flavonoles, 8 ácidos hidroxicinámicos, 2 dihidrochalconas, 7 ácidos hidroxibenzoicos, 3 flavan-3-oles monoméricos y 1 estilbeno.



**Figura 4.70:** Cromatograma general obtenido por PDA, perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y perfil de fluorescencia a 290-350 nm de la muestra de zumo comercial AntiOx Pingo doce.

**Tabla 4.103:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el zumo antiOx Pingo doce.

Nº	Identificación del compuesto	Cuantificación (mg/100 mL zumo)	Fruta de la que procede
ANTOCIANOS (Detección: abs 520 nm)			
AN-1	Delphinidin 3-O-glucósido	0,472	Grosella, arándano y uva
AN-2	Cianidin 3-O-sophorósido	1,813	Frambuesa
AN-3	Cianidin 3-O-glucósido	0,072	Todas frutas rojas
AN-4	Cianidin 3-O-galactósido	0,400	Arándano
AN-5	Delphinidin 3-O-rutinósido	0,609	Grosella
AN-6	Petunidin 3-O-glucósido	0,437	Uva tinta
AN-7	Pelargonidin 3-O-glucósido	0,826	Fresa y frambuesa
AN-8	Peonidin 3-O-galactósido	0,172	Arándano
AN-9	Cianidin 3-O-rutinósido	0,222	Frambuesa y grosella
AN-10	Peonidin 3-O-glucósido	1,447	Uva y arándano
AN-11	Malvidin 3-O-glucósido	0,080	Uva tinta
AN-12	Malvidin 3-O-(6''-acetyl-glucósido)	0,121	Uva tinta
AN-13	Malvidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido)	0,076	Uva tinta
FLAVONOLES (Detección: abs 360 nm)			
FN-1	Miricetin 3-O-arabinósido	0,049	Uva y arándano
FN-2	Miricetin 3-O-rutinósido	0,031	Fresa, frambuesa y grosella
FN-3	Quercetin 3-O-glucósido	0,039	Fresa y grosella
FN-4	Quercetin 3-O-galactósido	0,199	Arándano
FN-5	Quercetin 3-O-rhamnosido	0,033	Arándano
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Detección: abs 320 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 340 y $\lambda_{emi}$ 420 nm)			
HC-1	Ácido cafeoil-quínico	2,688	Grosella
HC-2	Ácido caftárico	7,907	Uva tinta
HC-3	Ácido p-Cumaroil-glucósido	5,867	Frambuesa, arándano, manzana, grosella y fresa
HC-4	Ácido cafeico	6,621	Fresa, frambuesa, grosella, uva, arándano y manzana
HC-5	Ácido clorogénico	1,469	Fresa, frambuesa, uva, arándano y manzana
HC-6	Ácido ferúlico 4-glucósido	1,007	Grosella y arándano
HC-7	Ácido p-Cumárico	0,515	Fresa, uva y arándano
HC-8	Ácido ferúlico	0,203	Arándano
DIHIDROCHALCONAS (Detección: abs 280 nm)			
CH-1	Floretin 2'O xilosil-glucósido	0,088	Manzana
CH-2	Floridzina	0,032	
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
HB-1	Ácido gálico	3,785	Fresa, frambuesa, uva, grosella y arándano
HB-2	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	2,903	Fresa, frambuesa, grosella, uva y arándano
HB-3	Ácido 4 hidroxibenzoico	5,342	Fresa, frambuesa y uva
HB-4	Ácido vanílico	3,163	Uva y arándano
HB-5	Ácido sirínico	3,069	Frambuesa, uva, grosella, arándano, fresa y manzana
HB-6	Ácido elágico 3-arabinósido	1,944	Frambuesa
HB-7	Ácido elágico	1,179	Fresa, frambuesa, grosella y arándano



**Tabla 4.104:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el zumo antiOx Pingo doce.

FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{\text{exc}}$ 290 y $\lambda_{\text{emi}}$ 350 nm)			
FL-1	(-)-Epigallocatequina	0,040	Fresa, arándano, uva y manzana
FL-2	(+)-Catequina	0,059	Todas las frutas
FL-3	(-)-Epicatequina	0,174	
ESTILBENOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{\text{exc}}$ 290 y $\lambda_{\text{emi}}$ 350 nm)			
ES-1	Resveratrol 3-glucósido	0,131	Grosella, manzana y uva
VITAMINA C (Detección: abs 243 nm)			
--	Ácido ascórbico	5,040	--
Total polifenoles individuales (TIP):		55,30	mg/100 mL zumo
Total polifenoles (TP):		102,60	mg GAE/100 mL zumo

Las frutas que componen este zumo comercial son rojas, excepto la manzana, los 13 antocianos identificados proceden de ellas. Cabe descartar que cada una de las frutas rojas se caracteriza por la presencia de un antociano determinado. Como por ejemplo cianidin 3-O-sophorósido (pico AN-2) que indica la presencia de frambuesa, cianidin 3-O-galactósido y peonidin 3-O-galactósido (picos AN-4 y AN-8) que están presentes en el arándano, delphinidin 3-O-rutinósido (pico AN-5) procedente de la grosella negra, pelargonidin 3-O-glucósido (pico AN-7) característico de la fresa, frambuesa y grosella negra o los picos AN-6, AN-11, AN-12 y AN-13 correspondientes con petunidin 3-O-glucósido, malvidin 3-O-glucósido, malvidin 3-O-(6''-acetil-glucósido) y malvidin 3-O-(6''-p-Cumaroil-glucósido) que solo están presentes en la uva tinta.

Cinco fueron los flavonoles identificados, su presencia es en poca concentración, proceden principalmente de arándano, fresa y grosella.

En cuanto al grupo de los ácidos hidroxycinámicos se detectaron 8 compuestos cuya procedencia fue de las diversas frutas que contienen el zumo. Si bien, la presencia de ácido cafeoil-quinico (pico HC-1) procede de la grosella, el ácido caftárico (pico HC-2) de la uva tinta y el ácido ferúlico (pico HC-8) del arándano. Las concentraciones más altas fueron para los ácidos caftárico (7,90 mg/100 mL), p-Cumaroil-glucósido (5,87 mg/100 mL) y cafeico (6,62 mg/100 mL).

Al contener este zumo manzana, se estudió la presencia de dihidrochalconas y se identificaron las dos características de la manzana, floretin 2-O-xilosil-glucósido (CH-1) y floridzina (CH-2).

Siete fueron los ácidos hidroxibenzoicos detectados a 260 nm y, con el perfil de fluorescencia procedente de las distintas frutas, se identificaron tres flavan-3-oles monoméricos y un estilbeno.

Respecto al contenido de polifenoles totales (TP), el etiquetado de este zumo indica un valor de 83 mg/100 mL mientras que el obtenido en los análisis ha sido de 55,30 mg/100 mL. La diferencia de valor probablemente se deba al contenido en vitamina C que el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu también contabiliza y que, en comparación con el resto de zumos comerciales estudiados, es de los valores más elevados.

### - Compal Vital antiox zumos rojos

Se analiza un zumo antioxidante con 4,1 °Brix procedente de la casa comercial portuguesa Compal Vital. La composición de dicho zumo según etiquetado indica que se ha elaborado a base de concentrados de: uva tinta, manzana, grosella, fresa, frambuesa y arándano; además de agua, antioxidante (ácido ascórbico) y edulcorantes (aspartato y acesulfamo k). Además, al ser comercializado en Portugal su etiquetado indica un contenido en polifenoles de 98 mg/100 mL.

El análisis por UHPLC para detectar antocianos (520 nm), flavonoles (360 nm), ácidos hidroxicinámicos (320 nm), dihidrochalconas (280 nm), ácidos hidroxibenzoicos (260 nm), flavan-3-oles monoméricos y estilbenos ( $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emi}} = 350 \text{ nm}$ ) se muestra en la Figura 4.71.

La Tabla 4.105 muestra la identificación de los principales polifenoles presentes en este zumo comercial. En total se identificaron 9 antocianos, 3 flavonoles, 4 ácidos hidroxicinámicos, 2 dihidrochalconas, 5 ácidos hidroxibenzoicos, 3 flavan-3-oles monoméricos y 1 estilbeno.

Los 9 antocianos proceden de las frutas rojas que componen el zumo. El cianidin 3-O-sophorósido (pico AN-2) procede de la frambuesa, delphinidin 3-O-rutinósido (pico AN-5) presente en la grosella o pelargonidin 3-O-glucósido (pico AN-7) característico de la fresa y frambuesa son los que se encuentran en mayor concentración.

Los flavonoles identificados fueron un total de 3 de los cuales el quercetin 3-O-galactósido (pico FN-3) procede del arándano.

Entre los ácidos hidroxicinámicos destaca el ácido *p*-Cumaroil-glucósido por su alta concentración, los ácidos caftárico y clorogénico también están en cantidades importantes.

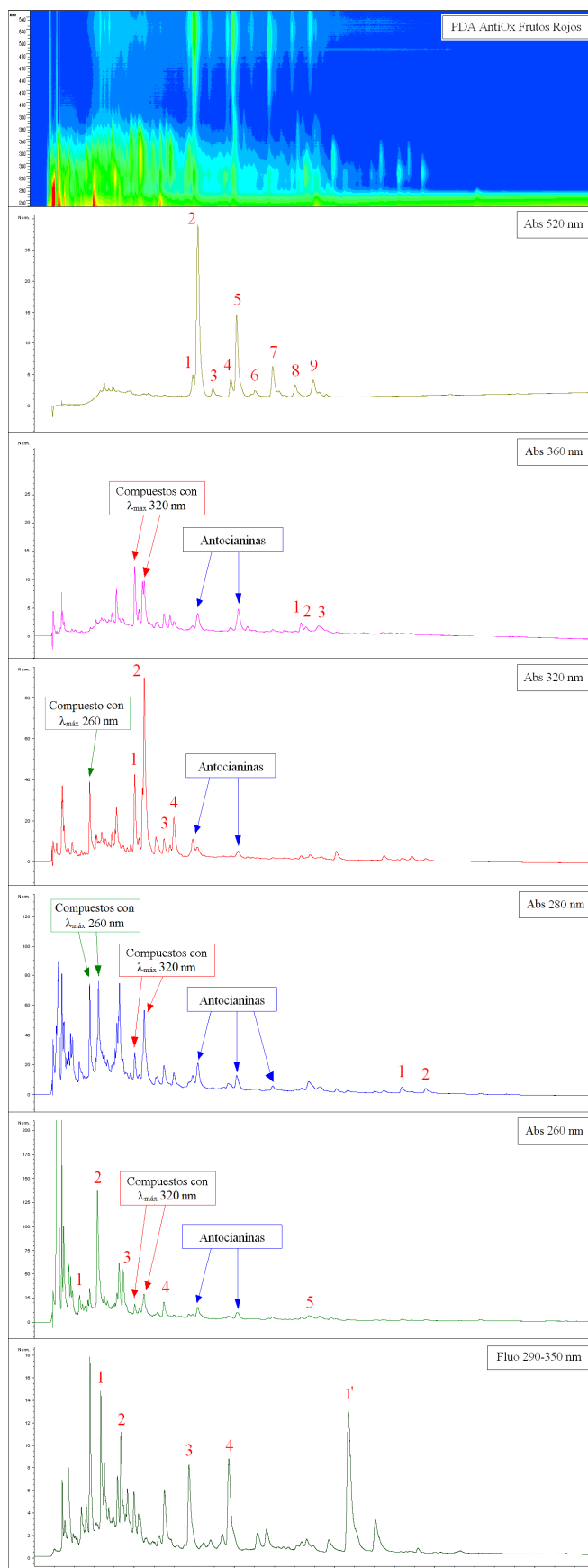
Las dos dihidrochalconas presentes proceden de la manzana y, se encontraron además 5 ácidos hidroxibenzoicos de los cuales destacan el ácido 3,4 dihidroxibenzoico por su alta concentración y el ácido 4-hidroxibenzoico. Además hay tres flavan-3-oles monoméricos y un estilbeno que se detectaron con el perfil de fluorescencia.

Además del análisis de los polifenoles individuales (TIP) por UHPLC también se realizó el análisis de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu; los resultados están recogidos en la Tabla 4.105.

La diferencia entre los valores obtenidos de polifenoles individuales (TIP): 37,48 mg/100 mL zumo y polifenoles totales (TP): 79,22 mg GAE/100 mL zumo, es significativa. El valor TIP vuelve a ser aproximadamente la mitad del valor del TP como en las muestras de zumos comerciales anteriormente descritos. Esta, es una diferencia cuantitativa entre los dos métodos que se constata en las distintas muestras que se han analizado.

Respecto al valor de TP obtenido es un poco inferior al del etiquetado del zumo. Se podría asumir como errores de medida o por envejecimiento del producto. La medida de TIP se realiza sobre las muestras de zumos centrifugadas y corresponde por tanto a polifenoles solubles, no teniendo en cuenta los que se hayan podido eliminar tras el centrifugado.

En cuanto al origen de este zumo, no se han detectado compuestos pertenecientes a otras frutas, por lo que se confirma así su autenticidad.



**Figura 4.71:** Cromatograma general obtenido por PDA, perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y perfil de fluorescencia a 290-350 nm de la muestra de zumo comercial Compal Vital Frutos Rojos.

**Tabla 4.105:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el zumo Compal de Frutos Rojos.

Nº	Identificación del compuesto	Cuantificación (mg/100 mL zumo)	Fruta de la que procede
ANTOCIANOS (Detección: abs 520 nm)			
AN-1	Delphinidin 3-O-glucósido	0,155	Arándano, grosella y uva
AN-2	Cianidin 3-O-sophorósido	1,609	Frambuesa
AN-3	Cianidin 3-O-glucósido	0,063	Todas frutas rojas
AN-4	Cianidin 3-O-galactósido	0,132	Arándano
AN-5	Delphinidin 3-O-rutinósido	0,723	Grosella
AN-6	Petunidin 3-O-glucósido	0,057	Uva
AN-7	Pelargonidin 3-O-glucósido	0,275	Fresa y frambuesa
AN-8	Peonidin 3-O-glucósido	0,128	Uva y arándano
AN-9	Malvidin 3-O-glucósido	0,187	Uva
FLAVONOLES (Detección: abs 360 nm)			
FN-1	Miricetin 3-O-rutinósido	0,040	Fresa, frambuesa y grosella
FN-2	Quercetin 3-O-rutinósido	0,031	Fresa, frambuesa y uva
FN-3	Quercetin 3-O-galactósido	0,034	Arándano
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Detección: abs 320 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 340 y $\lambda_{emi}$ 420 nm)			
HC-1	Ácido caftárico	3,823	Uva
HC-2	Ácido <i>p</i> -Cumaroil-glucósido	8,899	Fresa, frambuesa, manzana y arándano
HC-3	Ácido cafeico	1,351	Fresa, frambuesa, uva, grosella, arándano y manzana
HC-4	Ácido clorogénico	2,106	Fresa, frambuesa, uva, manzana y arándano
DIHIDROCHALCONAS (Detección: abs 280 nm)			
CH-1	Floretin 2`O xilosil-glucósido	0,095	Manzana
CH-2	Floridzina	0,114	
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
HB-1	Ácido gálico	1,744	Fresa, frambuesa, uva, arándano y grosella
HB-2	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	9,112	Fresa, frambuesa, uva, grosella y arándano
HB-3	Ácido 4 hidroxibenzoico	3,364	Fresa, frambuesa y uva
HB-4	Ácido vanílico	1,641	Arándano y uva
HB-5	Ácido elágico	0,231	Fresa, frambuesa, grosella y arándano
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
FL-1	(-)-Epigallocatequina	0,236	Fresa, uva, arándano y manzana
FL-2	(+)-Catequina	0,114	Todas las frutas
FL-3	(-)-Epicatequina	0,262	
ESTILBENOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
ES-1	Resveratrol 3-glucósido	0,945	Grosella, manzana y uva
VITAMINA C (Detección: abs 243 nm)			
--	Ácido ascórbico	20,579	--
Total polifenoles individuales (TIP):		37,48	mg/100 mL zumo
Total polifenoles (TP):		79,22	mg GAE/100 mL zumo

#### 4.5.2.- Smoothies

Los smoothies, tal y como se indicó en el Capítulo 1 de introducción, son bebidas no alcohólicas que se diferencian del resto de productos del mismo sector por su cremosidad convirtiéndose en una alternativa energética y vitamínica frente a los zumos. Se caracterizan por tener una consistencia algo densa, parecida a un batido pero algo más espeso. Se ha analizado un smoothie comercial con 12,1 °Brix procedente de la casa comercial Eroski y cuya composición según etiquetado es: zumo de manzana, puré de frambuesa (18 %), puré de fresa (15 %), puré de plátano (14 %), puré de arándano y zumo de naranja.

Se ha realizado el análisis por UHPLC de los distintos grupos de polifenoles para los que se ha desarrollado el método. El cromatograma general obtenido con el detector de fotodiodos (PDA), los perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm y el perfil de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 290$  nm y  $\lambda_{emi} = 350$  nm, se muestran en la Figura 4.72. Además, la Tabla 4.106 recoge la identificación de los picos para la que se tuvieron en cuenta los datos de las Tablas 4.56, 4.57, 4.58, 4.92 y 4.93.

Se han identificado los principales polifenoles presentes en este smoothie. La Tabla 4.106 muestra la numeración establecida en la Figura 4.72, la identificación de los compuestos, su cuantificación y la fruta de la que procede cada compuesto identificado.

En total se han identificado 7 antocianos, 7 ácidos hidroxicinámicos, 2 flavanonas, 1 dihidrochalcona, 5 ácidos hidroxibenzoicos, 3 flavan-3-oles monoméricos y 1 estilbeno.

La procedencia de los 7 antocianos identificados es clara ya que compuestos como pelagonidina 3-O-glucósido es característico de la fresa o cianidín 3-O-galactósido del arándano. Aún así, hay dos compuestos sin identificar (AN-6 y AN-8).

No se identificó ningún flavonol en esta muestra, pero si una dihidrochalcona característica de la manzana y 2 flavanonas características de la naranja.

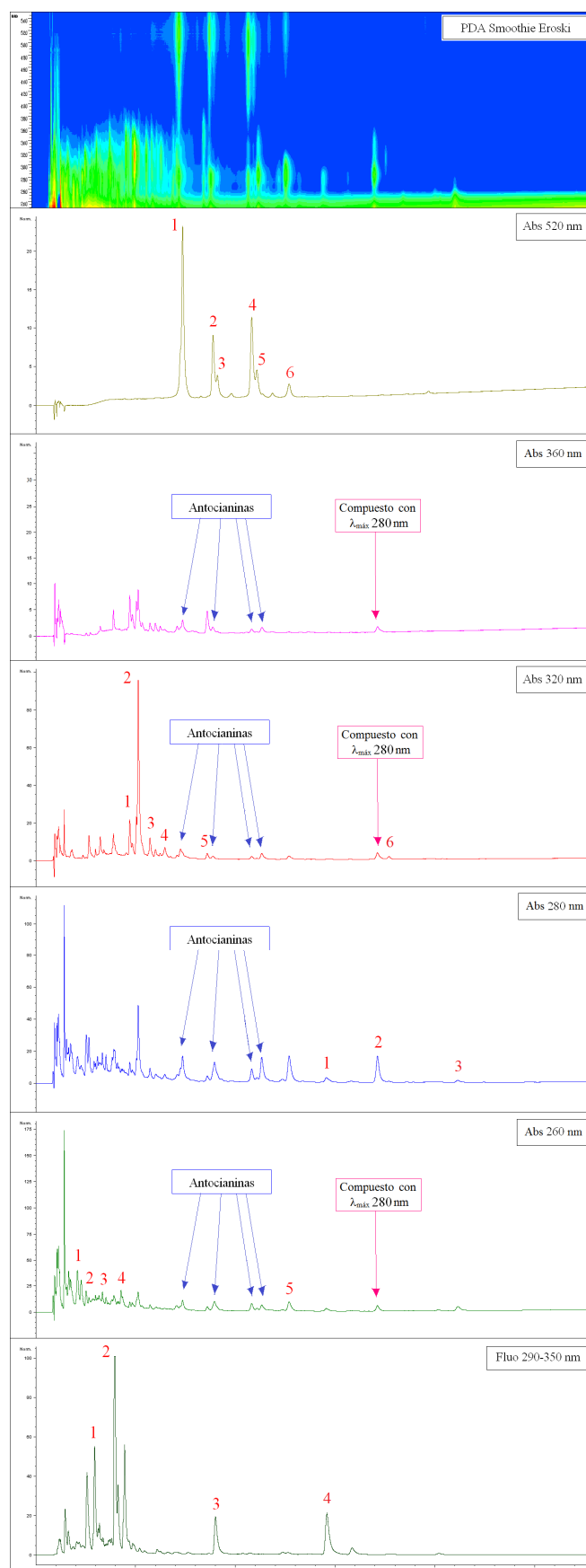
Siete fueron los ácidos hidroxicinámicos detectados y procedentes de todas las frutas que componen el smoothie a excepción del plátano que no presenta este grupo de polifenoles en su composición. Entre ellos destaca la concentración de ácido *p*-Cumaroil-glucósido (8,61 mg/100 mL) que no es tan alta como en el smoothie anterior, pero si es de las más altas entre todos los productos comerciales analizados.

Se detectaron 5 ácidos hidroxibenzoicos de los cuales el plátano aporta su presencia en los ácidos gálico y elágico.

Con el perfil de fluorescencia se detectaron 3 flavan-3-oles monoméricos aportados por las distintas frutas, y un estilbeno aportado por la manzana.

Además del análisis de los polifenoles individuales (TIP) por UHPLC también se realizó el análisis de los polifenoles totales (TP) por el método de Folin-Ciocalteu; los resultados están recogidos en la Tabla 4.106. El valor total de polifenoles individuales (TIP) ha sido de 33,58 mg/100 mL zumo, y el valor total de polifenoles (TP) fue de 141,60 mg GAE/100 mL zumo. La diferencia encontrada entre ambos valores es más elevada que la establecida en el caso de los zumos comerciales estudiados anteriormente, probablemente debido a que, para analizar por UHPLC este tipo de bebida, fue necesario centrifugar la muestra y eliminar la gran cantidad de materia en suspensión que contenía además de filtrar. Tras dicha centrifugación la gran cantidad de precipitado que se desechó y que no se analizó puede que contenga polifenoles.





**Figura 4.72:** Cromatograma general obtenido por PDA, perfiles de absorbancia a 520, 360, 320, 280 y 260 nm, y perfil de fluorescencia a 290-350 nm de la muestra de smoothie de la casa comercial Eroski.

**Tabla 4.106:** Detección e identificación de polifenoles presentes en el smoothie Eroski.

Nº	Identificación del compuesto	Cuantificación (mg/100 mL zumo)	Fruta de la que procede
ANTOCIANOS (Detección: abs 520 nm)			
AN-1	Cianidin 3-O-sophorósido	1,113	Frambuesa
AN-2	Cianidin 3-O-galactósido	0,352	Arándano
AN-3	Cianidin 3-O-glucósido	0,127	Fresa, frambuesa y arándano
AN-4	Pelargonidin 3-O-glucósido	0,513	Fresa y frambuesa
AN-5	Peonidin 3-O-galactósido	0,169	Arándano
AN-6	Peonidin 3-O-glucósido	0,103	
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (Detección: abs 320 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 340 y $\lambda_{emi}$ 420 nm)			
HC-1	Ácido <i>p</i> -Cumaroil-glucósido	8,610	Fresa, frambuesa, arándano, naranja y manzana
HC-2	Ácido cafeico	2,562	Fresa, frambuesa, naranja, manzana y arándano
HC-3	Ácido clorogénico	1,737	Fresa, frambuesa, naranja, manzana y arándano
HC-4	Ácido <i>p</i> -Cumárico	1,178	Fresa
HC-5	Ácido ferúlico	0,235	Arándano
HC-6	Ácido sinápico	0,308	
DIHIDROCHALCONAS (Detección: abs 280 nm)			
CH-1	Floretin 2`O xilosil-glucósido	0,039	Manzana
FLAVONAS (Detección: abs 280 nm)			
FV-1	Narirutina	0,168	Naranja
FV-2	Hesperidina	0,699	
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
HB-1	Ácido gálico	3,477	Fresa, frambuesa, plátano, arándano y naranja
HB-2	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	1,791	Fresa, frambuesa y arándano
HB-3	Ácido 4 hidroxibenzoico	1,690	Fresa y frambuesa
HB-4	Ácido siríngeo	0,892	Fresa, frambuesa, arándano y manzana
HB-5	Ácido elágico	0,761	Fresa, frambuesa, plátano y arándano
FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
FL-1	(-)-Epigallocatequina	1,765	Fresa, arándano, naranja, manzana y plátano
FL-2	(+)-Catequina	1,056	Todas las frutas
FL-3	(-)-Epicatequina	0,548	Fresa, frambuesa, arándano, naranja y manzana
ESTILBENOS (Detección: abs 260 nm y fluo $\lambda_{exc}$ 290 y $\lambda_{emi}$ 350 nm)			
ST-1	Resveratrol 3-glucósido	1,437	Manzana
VITAMINA C (Detección: abs 243 nm)			
--	Ácido ascórbico	1,808	--
Total polifenoles individuales (TIP):		33,58	mg/100 mL zumo
Total polifenoles (TP):		141,60	mg GAE/100 mL zumo

La aplicabilidad del método de análisis propuesto queda demostrada tras el análisis, identificación y cuantificación de los compuestos funcionales presentes en los zumos antiox y smoothies comerciales estudiados.





---

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

**5.1.-** La adición de un detector de fluorescencia, en línea con el de PDA, al método de análisis de antocianos en zumos por HPLC IFU nº 71, permite determinar en un solo análisis no solo antocianos, sino también otros flavonoides como ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos; además de otros pigmentos rojos no polifenólicos como son las betalainas y colorantes rojos alimentarios que se pueden añadir fraudulentamente a los zumos.

1. El tratamiento previo de las muestras se reduce a centrifugación y filtración, evitando procesos de extracción, concentración, o hidrólisis.
2. La detección e identificación de los polifenoles presentes en una muestra se hace según sus propiedades espectroscópicas, por absorbancia o por fluorescencia.
3. Los ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos se detectan en mayor número y con mejor señal por fluorescencia que por absorbancia.
4. Mediante el análisis por HPLC-PDA-FLUO se ha obtenido el perfil de antocianos, betalainas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en zumos de varias frutas rojas: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo, arándano americano, grosella negra, cereza, uva tinta, mora, zanahoria morada e higo chumbo.
5. El perfil de polifenoles característico de cada fruta se usa como “huella dactilar” y criterio de autenticidad de cada zumo. Estos perfiles se pueden aplicar para identificar y diferenciar, con uno o dos componentes característicos, la presencia de una fruta en una mezcla de zumos. También sirven para detectar posibles adulteraciones o errores que puedan haberse producido durante el procesado de los zumos de frutas.
6. Se han identificado en los zumos de las once frutas rojas estudiadas un total de 71 compuestos, de los cuales 33 son antocianinas, 22 son ácidos fenólicos, 3 flavan-3-oles monoméricos, 2 estilbenos y 4 betacianinas. Además se han analizado colorantes alimentarios rojos, 1 natural y 6 artificiales.

7. La Tabla de datos elaborada con la composición en polifenoles de las frutas rojas estudiadas y los colorantes rojos analizados es una herramienta útil para autenticar el origen de un zumo, tanto en el campo de la investigación en compuestos vegetales como en el de la industria de zumos y bebidas de fruta; además de ser una aportación a las bases de datos de composición de polifenoles en frutas.

**5.2.-** Partiendo de las condiciones de análisis del método anterior se ha obtenido un nuevo método de análisis de polifenoles por UHPLC-PDA-FLUO que utiliza ácido trifluoroacético y que sirve para determinar la composición de todos los polifenoles presentes en un zumo de fruta.

1. El empleo de un equipo de UHPLC mejora las condiciones de análisis ya que trabaja a mayor presión, reduciendo el tiempo de análisis y obteniendo una mayor resolución de los picos en los cromatogramas.
2. La sustitución del ácido fórmico por ácido trifluoroacético en la acidificación de las fases móviles permite trabajar con una menor concentración de ácido, mejora la línea base de los cromatogramas y reduce el riesgo de corrosión del equipo.
3. La columna Zorbax SB-C18 de 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, con un tiempo de análisis de 30 min, es la indicada en el análisis de zumos con un elevado número de polifenoles diferentes, mostrando una buena resolución de los compuestos. La temperatura óptima de análisis es de 25 °C y el flujo de trabajo establecido de 1 mL/min. La modificación del gradiente de elución con respecto al del método IFU nº 71 permite identificar un mayor número de polifenoles.
4. Para zumos en los que solo interese el perfil de antocianos se sugiere utilizar el método UHPLC IFU con una columna Zorbax SB-C18 de 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, pues permite trabajar con un tiempo de análisis de unos 20 minutos con la mejor resolución.

**5.3.-** El método analítico por UHPLC-PDA-FLUO sirve para detectar distintos grupos de polifenoles: antocianos, flavonoles, ácidos fenólicos, flavanonas, dihidrochalconas, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en zumos de fruta.

1. Mediante el análisis por UHPLC-PDA-FLUO se ha obtenido el perfil de flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas, ácidos fenólicos, flavan-3-oles monoméricos y estilbenos en zumos de naranja, manzana y plátano. También se ha obtenido el perfil de flavonoles en varias frutas rojas: fresa, frambuesa, mirtilo, arándano europeo, arándano americano, cereza, grosella negra, uva tinta y mora.
2. Se ha ampliado el perfil de polifenoles de distintos zumos, completando su “huella dactilar” e incrementando la información disponible para la autenticación y control de calidad de los zumos de frutas estudiados.
3. Se han identificado en los zumos de las doce frutas estudiadas un total de 16 flavonoles, 4 flavanonas y 2 dihidrochalconas. Esta información se suma a los datos obtenidos anteriormente y completa la Tabla de datos elaborada con la composición en polifenoles de las frutas estudiadas.

**5.4.-** Con el método de análisis de polifenoles en zumos de frutas por UHPLC-PDA-FLUO se pueden no solo identificar, sino también cuantificar los polifenoles presentes en un zumo dando un valor cuantitativo de polifenoles individuales, cuya suma sirve para obtener el valor de polifenoles totales individuales (TIP). Se mejora así la información analítica obtenida con respecto a métodos colorimétricos como el de Folin-Ciocalteu que solo da un valor conjunto de polifenoles totales (TP).

1. Se han cuantificado los polifenoles presentes en un zumo utilizando un compuesto como patrón estándar para cada grupo de polifenoles estudiado; se calibra el método con el patrón seleccionado y se establece la cuantificación del resto de polifenoles pertenecientes a ese grupo en base a la relación de áreas entre el patrón y cada compuesto presente. Se identifican y cuantifican así los polifenoles individuales presentes en un zumo.



2. Los resultados obtenidos en la cuantificación de los diferentes grupos de polifenoles en las frutas estudiadas nos indica que las frutas con mayor cantidad de antocianos son el mirtilo y la grosella negra. Los dos tipos de arándano estudiados muestran la mayor composición en flavonoles. La manzana, el arándano americano, la cereza y el mirtilo son las frutas con mayor presencia de ácidos hidroxicinámicos. La frambuesa, la grosella negra y la uva tinta son las frutas con mayor presencia en estilbenos. El plátano y la grosella negra presentan la mayor cantidad de flavan-3-oles monoméricos. En cuanto a la presencia de ácidos hidroxibenzoicos destacan los dos arándanos, el mirtilo y la grosella negra.
3. El método de UHPLC-PDA-FLUO es más específico y aporta una mayor información que el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu en el que, para el análisis de zumos, los valores deben ser corregidos sustrayendo el valor de contenido en vitamina C del zumo.

**5.5.-** Con el análisis de zumos de frutas antiox y smoothies comerciales mediante el método de UHPLC-PDA-FLUO se ha comprobado la utilidad práctica del método para el control de calidad y autenticación del origen de estos productos.





---

## CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aaby, K.; Mazur, S.; Nes, A. & Skrede, G. (2012) Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132, 86-97.
- ❖ Acosta-Montoya, O.; Vaillant, F.; Cozzano, S.; Mertz, C.; Pérez, A.M. & Castro, M.V. (2010) Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119, 1497-1501.
- ❖ Alasalvar, C.; Al-Farsi, M.; Quantick, P.C.; Shahidi, F. & Wiktorowicz, R. (2005) Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, 89, 69-76.
- ❖ Allegra, M.; Furtmüller, P.G.; Jantschko, W.; Zederbauer, M.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A. & Obinger, C., (2005) Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 837-844.
- ❖ Amic D, Davidovic-Amic, D. & Trinajstić, N. (1993) Application of topological indices to chromatographic data: Calculation of the retention indices of anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, 653, 1, 115-121.
- ❖ Andersen, O.M. (1989). Anthocyanins in fruits of *Vaccinium oxycoccus* L. (small cranberry). *Journal of Food Science*, 54; 383-384.
- ❖ Andreu-Navarro, A.; Fernández-Romero, J.M. & Gómez-Hens, A. (2010) Long-Wavelength Fluorescence Detection of Flavonoids in Orange Juices by LC. *Chromatographia*, 72, 1115-1120.
- ❖ Arts, I.C.; Van de Putte, B. & Hollman, P., (2000) Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1746-1751.
- ❖ Azeredo; H. (2008) Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2365- 2376.
- ❖ Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; Pistell, P.J.; Poosala, S.; Becker, K.G.; Boss, O.; Gwinn, D.; Wang, M.; Ramaswamy, S.; Fishbein, K.W.; Spencer,

- R.G.; Lakatta, E.G.; Le Couteur, D.; Shaw, R.J.; Navas, P.; Puigserver, P.; Ingram, D.K.; de Cabo, R. & Sinclair, D.A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444 (7117):337-42.
- ❖ Baydar, N.G.; Ozkan, G. & Sagdic, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Chemistry*, 15, 335-339.
  - ❖ Benavente-García, O. & Castillo, J. (2008) Update on Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6185-6205.
  - ❖ Bermúdez-Soto, M.J. & Tomás-Barberán, F.A. (2004) Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research Technology*, 219, 133-141.
  - ❖ Bleve, M.; Ciurlia, L.; Erroi, E.; Lionetto, G.; Longoc, L.; Rescioa, L. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64, 192-197.
  - ❖ Bobinaite, R.; Viškelis, P. & Venskutonis, P.R. (2012) Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus spp.*) cultivars. *Food Chemistry*, 132, 1495-1501.
  - ❖ Bowen-Forbes, C.S.; Zhang, Y. & Nair, M.G. (2010) Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 554-560.
  - ❖ Branzanti, E. (1989). La fresa. Editorial Mundi Prensa. ISBN: 8471142546.
  - ❖ Bravo, M.N.; Silva, S.; Coelho, A.V.; Vilas Boas, L. & Bronze, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, 84-92.
  - ❖ Breitfellner, F.; Solara, S. & Sontag, G. (2003) Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries. *Radiation Physics and Chemistry*, 67, 497-499.

- ❖ Bucic-Kojic, A.; Planinic, M.; Tomas, S.; Bilic, M. & Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.
- ❖ Bureau, S.; Renard, C.M.; Reich, G.C.; Ginies, C. & Audergon, J.M. (2009) Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *Food Science and Technology*, 42, 372-377.
- ❖ Burns, J.; Gardner, P.; O'Neil, J.; Crawford S.; Morecroft, I.; McPhalin D.; Lister, C.; Matthews, D.; MacLean, M.; Lean, M.; Duthie, G. & Crozier, A. (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Food Chemistry*, 48, 220-30.
- ❖ Cimpoiu, C. (2006). Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29, 1125-1142.
- ❖ Cantos, E.; Espín, J.C. & Tomás-Barberán, F.A. (2001). Postharvest induction modelling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new “functional” fruit? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5052-5058.
- ❖ Caridi, D.; Trenerry, V.C.; Rochfort, S.; Duong, S.; Laughher, D. & Jones, R. (2007) Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105, 691-699.
- ❖ Castellar, M.R.; Obón, J.M.; Alacid, M. & Fernández-López, J.A. (2003) Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2772-2776.
- ❖ Castellar, M.R.; Obón, J.M. & Fernández-López, J.A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 122-128.
- ❖ Charrouf, Z.; Hilali, M.; Jauregui, O.; Soufiaoui, M. & Guillaume, D. (2007) Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 100, 4, 1398-1401.

- ❖ Cerezal, P. & Duarte, G. (2004) Influencia sensorial de aditivos químicos en tunas (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) peladas en almíbar conservada por métodos combinados. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 6.
- ❖ Chang, S.F.; Hsieh, C.L. & Yen, G.C. (2008) he protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food Chemistry*, 106, 569-575.
- ❖ Chaovanalikit, A. & Wrolstad, R.E. (2004) Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 73-83.
- ❖ Cheigh, C.I.; Chung, E.Y. & Chung, M.S. (2012) Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110, 472-477.
- ❖ Chen, H.; Zuo, Y. & Deng, Y. (2001) Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913, 387-395.
- ❖ Chen, H. & Zuo, Y. (2007) Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. *Food Chemistry*, 101, 1357-1364.
- ❖ Chen, G. & Luo, J. (2010) Anthocyanins: Are They Beneficial in Treating Ethanol Neurotoxicity? *Neurotox Res*, 17, 91-101.
- ❖ Cheng, G.W. & Breen, P.J. (1991) Activity of phenylalanine ammonialyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 865-869.
- ❖ Cimpoi, C. (2006). Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29, 1125-1142.
- ❖ Coque Fuertes, M. (2006) El cultivo del manzano variedades de sidra y mesa. *Editorial: Madú*. ISBN: 8495998874.
- ❖ Corrales, M.; Fernández-García, A.; Butz, P. & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.
- ❖ Crosby, G.A. (2005) Lignans in food and nutrition. *Food Technology*, 59, 5, 32-35.

- ❖ De Leo, M.; Bruzual De Abreu, M.; Pawlowska, A. M.; Cioni, P. L. & Braca, A.; (2010). Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochemistry Letters*, 3, 48-52.
- ❖ De Pascual-Teresa, S. & Sánchez-Ballesta, M.T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry*, Revision, 7, 281-299.
- ❖ De Rijke, E.; Out, P.; Wilfried, N.A.; Ariese, F.; Gooijer, C. & Brinkman, U.A. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- ❖ Díaz-García, M.C.; Obón, J.M.; Lozano, M. & Castellar, M.R. (2010) “Beneficios para la salud de los frutos de *Opuntia spp.*” *Jornadas de Introducción a la Investigación en la UPCT*, 3, 15-17. ISSN (1888-8356). Depósito legal: MU-1618-2008.
- ❖ Díaz Medina, E.M.; Rodríguez Rodríguez, E. M. & Díaz Romero, C. (2007) Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, 103, 38-45.
- ❖ Drawert, F.; Leupold, G. & Pivernetz, H. (1980) Quantitative gas chromatographische Bestimmung von Rutin, Hesperidin und Naringenin in Orangensaft. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 6, 189-191.
- ❖ Dyrby, M.; Westergaard, N. & Stapelfeldt, H. (2001) Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72, 4, 431-437.
- ❖ El-Gharras, H. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512-2518.
- ❖ Ennouri, M.; Fetoui, H.; Bourret, E.; Zeghal, N.; Guermazi, F. & Attia, H. (2006) Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. Influence of seed supplemented diet on rats. *Bioresource Technology*, 97, 2136-2140.
- ❖ Esquivel, P.; (2004) Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Mesoamerican Journal of Agronomy - Agriculture and Livestock*, 15, 215-219.
- ❖ Fan-Chiang, F.J. & Wrolstad, R. (2005) Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *Journal of Food Science*, 70, 3, 198-202.
- ❖ Fang, F.; Li, J.M.; Pan, Q.H. & Huang, H.D. (2007) Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101, 428-433.



- ❖ Fernández-López, J.A.; Castellar, M.R.; Obón, J.M. & Almela, L. (2002) Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. *Chromatographia*, 56, 591-595.
- ❖ Fernández-López, J.A.; Castellar, M.R.; Obón, J.M. & Almela, L. (2007) Monitoring by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry the Impact on pH and temperature on the Pigment Pattern of Cactus Pear Fruit Extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 45, 120-125.
- ❖ Ferretti, G.; Bacchetti, T; Belleggia, A. & Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: From farm to table. Review. *Molecules*, 15, 6993-7005.
- ❖ Feucht, W. (2008) Cultivo de cerezos y ciruelos. *Editorial: Omega*. ISBN: 9788428214278.
- ❖ Franco-Zavaleta, M. (2004) Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de jiotilla (*escontria chiotilla*) una cactácea subexplotada. Tesis de maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
- ❖ Froytlog, C.; Slimestad, R. & Andersen, O.M. (1998) Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins-applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *Journal Chromatography A*, 825, 89-95.
- ❖ Fu, L.; Xu, B.T.; Xu, X.R.; Gan, R.Y.; Zhang, Y.; Xia, E.Q. & Li, H.B. (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.
- ❖ Fügél, R.; Carle, R. & Schieber, A. (2005) Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 433-441.
- ❖ Galán Sauco, V. (1992) Plátano (banano). Editorial: Mundi Prensa. ISBN: 847114395X.
- ❖ Galati, E. M.; Tripodo, M. M.; Trovato, A.; Miceli, N. & Monforte, M. T. (2002) Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*) waste matter. Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 17-21.
- ❖ Gancel, A.L.; Feneuil, A.; Acosta, O.; Pérez, A.M. & Vaillant, F. (2011) Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity

- of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, 44, 2243-2251.
- ❖ García-Alonso, F.J. (2005). Tesis Doctoral Europea. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes.
  - ❖ Garcia-Viguera, C.; Zafrilla, P.; Romero, F.; Abellán, P.; Artés, F. & Tomás-Barberán, F.A. (1999) Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *Journal of Food Science*, 64, 243-247.
  - ❖ Gentile, C.; Tesoriere, L.; Allegra, M.; Livrea, M.A.; D'Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 481-496.
  - ❖ Gil, M.I.; Holcroft, D.M. & Kader, A.A. (1997) Changes in Strawberry Anthocyanins and Other Polyphenols in Response to Carbon Dioxide Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1662-1667.
  - ❖ Giusti, M.M.; Rodriguez-Saona, L.E.; Baggett, J.R.; Reed, G.L.; Durst, R.W. & Wrolstad, R.E. (1998) Anthocyanin pigment composition of red-radish cultivars as potential food colorants. *Journal of Food Science*, 63, 219-224.
  - ❖ Giusti, M.M.; Rodriguez-Saona, L.E. & Wrolstad, R.E. (1999) Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4631-4637.
  - ❖ Goiffon, J.P.; Brun, M. & Bourrier, M.J. (1991) High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. *Journal Chromatography A*, 537, 101-121.
  - ❖ Goiffon, J.P.; Mouly, P.P. & Gaydou, E.M. (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 382, 39-50.
  - ❖ Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007) HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618-626.
  - ❖ González-SanJose, M. L. & Diez, C. (1992) Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chemistry*, 43, 193-197.

- ❖ Guerrero, R.F.; Puertas, B.; Fernández, M.I.; Palma, M. & Cantos-Villar, E. (2010) Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 231-238.
- ❖ Gruz, J.; Novak, O. & Strnad, M. (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC MS/MS. *Food Chemistry*, 111, 789-794.
- ❖ Giusti, M. & Wrolstad, R. (2003) Review - Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.
- ❖ Hagerman, A.E. (2002) Tannin Handbook, Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA.
- ❖ Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, S.; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J. & Törrönen, R. (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32, 345-353.
- ❖ Häkkinen, S. & Törrönen, R. (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research Internacional*, 33, 517-524.
- ❖ Hassan, H. & Yousef, M.I. (2009) Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2332-2337.
- ❖ Hernández-Pérez, J.M. (2005) Cromatografía líquida de alta eficacia. *Educación Continuada en el Laboratorio Clínico*, 8, 49-62.
- ❖ Hollman, P. & Arts, I. (2000) Review: Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1081-1093.
- ❖ Huang, X. & Mazza, G. (2011) Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3890-3899.
- ❖ IFU Method N° 71 (1998) Anthocyanins
- ❖ Ignat, I.; Volf, I. & Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.

- ❖ Iwashina, T. (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113: 287-299.
- ❖ Jakobek, L.; Seruga, M.; Medvidovic-Kosanovic M. & Novak, I. (2007) Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103, 58-64.
- ❖ Jakobek, L.; Seruga, M.; Novak, I. & Medvidovic-Kosanovic M. (2007) Flavonols, Phenolic Acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103, 369-378.
- ❖ Jakobek, L.; Seruga, M.; Voca, s.; Sindrak, Z. & Dobricevic, N. (2009) Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. *Lapins*) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123, 23-28.
- ❖ Kammerer, D.; Carle, R. & Schieber, A. (2003) Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota ssp. sativus var. atropurpureus* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2407-2412.
- ❖ Kanner, J.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B. & Kinsella, J. E. (1994) Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 42, 64.
- ❖ Karaman, Ş.; Tutem, E.; Sozgen, K.; Başkan, K.S. & Apak, R. (2010) Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Food Chemistry*, 120, 1201-1209.
- ❖ Katsube, N.; Iwashita, K.; Tsushida, T.; Yamaki, K. & Kobori, M. (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 68-75.
- ❖ Khandare, V.; Walia, S.; Singh, M. & Kaur, C. (2011) Black carrot (*Daucus carota ssp. sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Technology*, 89, 482-486.
- ❖ Kim, J.H.; Park, S.M.; Ha, H.J.; Moon, C.J.; Shin, T.K.; Kim, J.M.; Lee, N.H.; Kim, H.C.; Jang, K.J. & Wie, M.B. (2006) *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 257-262.

- ❖ Kirakosyan, A.; Seymour, E.M.; Urcuyo, D.; Kaufman, P.B. & Bolling, S. (2009) Chemical prolife and antioxidant capacities of tart cherry products. *Food Chemistry*, 115, 20-25.
- ❖ Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M. & Gliszczynska-Swiglo, A. (2007) Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
- ❖ Kumazawa, S.; Ikenaga, M.; Usui, Y.; Kajiya, K.; Miwa, S.; Endo, J.; Chikasawa, C.; Suzuki, Y.; Suzuki, Y.; Shimoi, K. & Nakayama, T. (2007) Comprehensive Analysis of Polyphenols in Fruits Consumed in Japan. *Food Science and Technology*, 13, 4, 404-413.
- ❖ Lecerf, J.M. (2006) Functional claims of article 13: Polyphenols in juices and processed fruits and vegetables. References and scientific evidences. *Pasteur Institute-AIJN-ADEPALE*.
- ❖ Lee J. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278.
- ❖ Lee, J.; Dossett, M. & Finn, C.E. (2012) Review: Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130, 785-796.
- ❖ Li, P.; Wang, Y.; Ma, R. & Zhang, X (2005). Separation of tea polyphenol from green tea leaves by a combined CATUFM-adsorption resin process. *Journal of Food Engineering*, 67, 253-260.
- ❖ Liu, Q.; Cai, W. & Shao, X. (2008). Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*, 77, 679 683.
- ❖ Loro, J.F.; Del Río, I. & Perez-Santana, L. (1999). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*; 67, 213-218.
- ❖ Lopes da Silva, F.; Escribano-Bailón, M.T.; Pérez Alonso, J.J.; Rivas-Gonzalo, J. & Santos-Buelga, C. (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT*, 40, 374-382.
- ❖ Markham, K. R. (1982) Techniques of Flavonoid Identification, *Academic Press. London*.

- ❖ Martínez Febrer, J. (1983) Cultivo del naranjo, limonero y otros agrios. *Editorial: Sintesis*. ISBN: 8430202579.
- ❖ Martínez-Florez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M. & Muñón, M.J. (2002) Revisión. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria XVII*, 6, 271-278.
- ❖ Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. & Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- ❖ Mazza, G. (2007) Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanità*, 43, 369-374.
- ❖ McMaster, M.C. (2005) LC/MS: A Practical's User Guide, John Wiley & Sons, NJ, USA.
- ❖ Mozetik, B.; Trebse, P.; Simcic, M. & Hribar, J. (2004) Changes of anthocyanins and hydroxycinnamic acids affecting the skin colour during maturation of sweet cherries (*Prunus avium L.*). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 123-128.
- ❖ Mullen, W.; Lean, M. & Crozier, A. (2002) Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 966, 63-70.
- ❖ Mullen, W.; Marks, S.C. & Crozier, A. (2007) Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3148-3157.
- ❖ Müller, E.; Berger, R.; Blass, E.; Sluyts, D. & Pfennig, A. (2008). Ullmanns encyclopedia of industrial chemistry, Liquid-Liquid Extraction.
- ❖ Naczki, M. & Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- ❖ Navindra P. S. (2008) Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627-629.
- ❖ Netzel, M.; Netzel, G.; Tian, Q.; Schwartz, S. & Konczak, I. (2007) Native Australian fruits - a novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 339-346.

- ❖ Nowakowska, Z. (2007) A Review of Antiinfective and Antiinflammatory Chalcones. *European Journal of Medicine Chemistry*, 42, 2, 125-137.
- ❖ Obón, J.M.; Castellar, M.R.; Cascales, J.A.; Almela, L. & Fernández-López, J.A. (2003). Propiedades multifuncionales del higo chumbo. II National Congress on Food Science and Technology, *Ed by CEE Limencop, S.L.*, Orihuela, Alicante, 229-232.
- ❖ Obón, J.M.; Díaz-García, M.C.; Castellar, M.R. (2011) Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal Food Composition Analysis*, 24, 760-771.
- ❖ Palenzuela, B.; Arce, L.; Macho, A.; Muñoz, E.; Ríos, A. & Valcarcel, M. (2004). Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 2021-2027.
- ❖ Park, E.H. & Kahng, J.H. (2001) An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia*, 72(3), 288-90.
- ❖ Piotrowska, H.; Kucinska, M. & Murias, M. (2012) Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research*, 750, 60-82.
- ❖ Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S.J. & Shahabimajd, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (11), 1142-1145.
- ❖ Prasain, J.K.; Wang, C.C. & Barnes, S. (2004) Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Bio Medicine*, 37, 1324-1350.
- ❖ Rastija, V., & Medic-Šaric, M. (2009) Chromatographic methods for the analysis of polyphenols in wines. *Chemistry in Industry*, 58, 121-128.
- ❖ Reemtsma, T. (2003) Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal Chromatography A*, 1000, 477-501.
- ❖ Ribereau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. & Lonvaud, A. (2003). Trattado di Enologia. Microbiologia del vino e Vinificazioni. 2ª Ed. Edagricole: Bologna. Vol.I. pp. 241-264.

- ❖ Robards, K. & Antolovich, M. (1997) Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. A Review. *The Analyst*, 122, 11R-34R.
- ❖ Rodríguez-Medina, I.C.; Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2009) Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4736-4744.
- ❖ Russell, W.; Labat, A.; Scobbie, L.; Duncan, G. & Duthie, G. (2009) Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*, 115, 100-104.
- ❖ Sadilova, E.; Stintzing, F.C.; Kammerer, D.R. & Carle, R. (2009) Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research Internacional*, 42, 1023-1033.
- ❖ Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H. & Kanazawa, K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetable, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.
- ❖ Salunkhe, D.K. & Kadam S.S. (1995) Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing. ISBN 0824796438.
- ❖ Schieber, A.; Stintzing, F.C. & Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.
- ❖ Scott, R.P.W. (2002) Principles and practice of chromatography. *Chrom-Ed Book Series*.
- ❖ Silva, E.M.; Pompeu, D.R.; Larondelle, Y. & Rogez, H. (2007) Optimization of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. *Separation and Purification Technology*, 53, 274-280.
- ❖ Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.; Simonic, M. & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89, 191-198.



- ❖ Skoog, D.A.; Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2003) Principios de análisis instrumental. *Editorial Mc Graw-Hill*. Madrid. 786.
- ❖ Spacil, Z.; Novakova, L. & Solich, P. (2008) Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, 76, 189-199.
- ❖ Spanos, G. A. & Wrolstad, R. E. (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of *Thompson* seedless grape juice. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 38, 1565-1571.
- ❖ Sreekanth, D.; Arunasree, M.; Roy, K.; Chandramohan, T.; Reddy, G. & Reddanna, P. (2007) Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*, 14, 739-746.
- ❖ Stintzing F.C. & Carle R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 19-38.
- ❖ Stintzing, F.C.; Trichterborn, J. & Carle, R. (2006) Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94, 296-309.
- ❖ Stintzing, F.C. & Carle, R. (2007) Betalains - emerging prospects for food scientists. Review. *Food Science and Technology*, 18, 514-525.
- ❖ Stój, A.; Malik, A. & Targoński, Z. (2006) Comparative analysis of anthocyanin composition of juices obtained from selected species of berry fruits. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 15/56, 4, 401-407.
- ❖ Tesoriere, L.; Butera, D.; D'Arpa, D.; Di Gaudio, F.; Allegra, M.; Gentile, C. & Livrea, M. A. (2003) Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radical Research*, 37, 689-696.
- ❖ Tesoriere, L.; Butera, D.; Pintaudi, A.M.; Allegra, M. & Livrea, M.A. (2004) Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C1-3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80,391-395.

- ❖ Tesoriere, L.; Butera, L.; Allegra, M.; Fazzari, M. & Livrea, M.A. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1266-1270.
- ❖ The new Cactus Lexicon (2006). Description and illustrations of the cactus family compiled and edited by members of the *Internacional Cactaceae Systematics Group*. ISBN-0-9538134-4-4.
- ❖ Tian, Q.; Giusti, M.M.; Stoner, G.D. & Schwartz, S.J. (2005) Screening for anthocyanins using HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursorion analysis, production analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1091, 72-82.
- ❖ Tian, S.; Nakamura, K.; Cui, T. & Kayahara, H. (2005) High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal Chromatography A*, 1063, 121-128.
- ❖ Titus, D. (2008). Smoothies! The original smoothie book. Chino Hills, CA, USA: *Juice Gallery*.
- ❖ Tsanova-Savova, S.; Ribarova, F. & Gerova, M. (2005) (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Análisis*, 18, 691-698.
- ❖ Tsao, R. & Yang, R. (2003) Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018, 29-40.
- ❖ Valls, J.; Millán, S.; Martí, M.P.; Borràs, E. & Arola, L. (2009) Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143-7172.
- ❖ Verde Méndez, C.; Forster, M.P.; Rodríguez-Delgado, M.; Rodríguez-Rodríguez, E.M. & Díaz Romero, C. (2003) Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. *European Food Research and Technology*, 217, 287-290.

- ❖ Versari, A.; Barbanti, D.; Biesenbruch, S. & Farnell, P.J. (1997) Analysis of anthocyanins in red fruits by use of HPLC/spectral array detection. *Italian Journal of Food Science*, 9, 141-148.
- ❖ Viñas, P.; Campillo, N.; Hernández-Pérez, M. & Hernández-Córdoba, M. (2008) A comparison of solid-phase microextraction and absorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Analytica chimica acta*, 611, 119-125.
- ❖ Volpi, N.; Bergonzini, G. (2006) Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC- electrospray mass spectrometry. *Pharm. Biomed. Analytical*, 42, 354-361.
- ❖ Wang, L. & Stoner, G.D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*, 269, 281-290.
- ❖ Wang, S.Y.; Chen, C. & Wang, C.Y. (2009) The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, 112, 676-684.
- ❖ Wang, C. & Zuo, Y. (2011) Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, 128, 562-568.
- ❖ Wrolstad, R.E.; Durst, R.W. & Lee, J. (2005) Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 423-428.
- ❖ Wu, X. & Prior, R. (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common fruits in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599.
- ❖ Zadernowski, R.; Czaplicki, S. & Naczek, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112, 685-689.
- ❖ Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wua, T., & Wang, Z. (2009) Antioxidant phenolic.
- ❖ Zheng, Y.; Wang, S.Y.; Wang, C.Y. & Zheng, W. (2007) Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT*, 40, 49-57.
- ❖ Zou, D.M.; Brewer, M.; García, F.; Feugang, J.M.; Wang, J.; Zang, R.; Liu, H. & Zou, C. (2005) Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4, 25-37.

- ❖ Zuo, Y.; Chen, H. & Deng, Y. (2002) Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, 307-316.

**Direcciones de internet consultadas:**

- ❖ [www.aijn.org](http://www.aijn.org) (Association of the Industry of Juices and Nectars - EU)
- ❖ [www.asozumos.org](http://www.asozumos.org) (Asociación Española de Fabricantes de Zumos)
- ❖ [www.bedca.net](http://www.bedca.net) (Base de Datos Española de Composición de Alimentos)
- ❖ [www.boe.es](http://www.boe.es) (Portal del Boletín Oficial del Estado)
- ❖ [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org) (The Codex Alimentarius Commission)
- ❖ [www.consumer.es/alimentacion](http://www.consumer.es/alimentacion) (Portal de Alimentación)
- ❖ [www.compall-international.com](http://www.compall-international.com) (Zumos Compall)
- ❖ [www.cromadex.com](http://www.cromadex.com) (The Cromadex General Industrial)
- ❖ [www.garciacarrion.es](http://www.garciacarrion.es) (J. García Carrión)
- ❖ [www.garciacarrion.es/es/donsimon](http://www.garciacarrion.es/es/donsimon) (Zumos Don Simón)
- ❖ [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu) (The European Food Safety Authority).
- ❖ [www.eurofir.net](http://www.eurofir.net) (9th International Food Data Conference – Norwich 2011)
- ❖ [www.fao.org](http://www.fao.org) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
- ❖ [www.ifu-fruitjuice.com](http://www.ifu-fruitjuice.com) (International Federation of Fruit Juice Producers)
- ❖ [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com) (Toda la Agricultura en internet)
- ❖ [www.isoflavones.info](http://www.isoflavones.info) (Isoflavonas)
- ❖ [www.minutemaid.com](http://www.minutemaid.com) (Zumos Minute Maid)
- ❖ [www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu) (Database on Polyphenol Content in Foods)
- ❖ [www.pingodoce.pt](http://www.pingodoce.pt) (Zumos Pingo doce S.A.)
- ❖ [www.smoothiecentral.com](http://www.smoothiecentral.com) (Juice and Smoothie Association of U.S.A.)
- ❖ [www.usda.gov](http://www.usda.gov) (U. S. Department of Agriculture Database)



---

## TABLA DE ABREVIATURAS



**Tabla de abreviaturas:**

4HB	Ácido 4 hidroxibenzoico
Caf	Ácido cafeico
Cat	(+)-Catequina
Chlo	Ácido clorogénico
Cy-3ara	Cianidin 3-O-arabinosido
Cy-3gal	Cianidin 3-O-galactosido
Cy-3glu	Cianidin 3-O-glucosido
Cy-3glu-rut	Cianidin 3-O-glucosil-rutinosido
Cy-3manol	Cianidin 3-O-(6``malonil-glucosido)
Cy-3oxa	Cianidin 3-O-(6``diaxilil-glucosido)
Cy-3rut	Cianidin 3-O-rutinosido
Cy-3sho	Cianidin 3-O-sophorosido
Cy-3xyl	Cianidin 3-O-xilosido
Cy-3xyl-glu-gal	Cianidin 3-O-xilosil-glucosil-galactosido
Cy-3-xyl-gal	Cianidin 3-O- xilosil galactosido
Cy-3xyl-gal-fer	Cianidin 3-O- xilosil galactosido-ferúlico
Cy-3xyl-gal-syn	Cianidin 3-O- xilosil galactosido-sinápico
Cy-3xyl-glu-gal-cou	Cianidin 3-O- xilosil-glucosil galactosido p-cumárico
DHB	Ácido 3,4 dihidroxibenzoico
Dp-3ara	Delphinidin 3-O-arabinosido
Dp-3gal	Delphinidin 3-O- galactosido
Dp-3glu	Delphinidin 3-O- glucosido
Dp-3rut	Delphinidin 3-O-rutinosido
Ella	Ácido elágico
Epi	(-)-Epicatechina
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fer	Ácido ferúlico
Gal	Ácido gálico
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
Mv-3acet-glu	Malvidin 3-O-(6``acetil-glucosido)
Mv-3ara	Malvidin 3-O- arabinosido
Mv-3gal	Malvidin 3-O- galactosido
Mv-3glu	Malvidin 3-O- glucósido
Mv-3cou-glu	Malvidin 3-O-(6``p-cumaroil-glucosido)
OMS	Organización Mundial de la Salud
pCou	Ácido p-cumárico
PDA	Photodiode Array Detector
Pg-3glu	Pelargonidin 3-O-glucosido
Pg-3rut	Pelargonidin 3-O-rutinosido
Pg-3sho	Pelargonidin 3-O-sophorosido
Pn-3ara	Peonidin 3-O-arabinosido
Pn-3gal	Peonidin 3-O-galactosido
Pn-3glu	Peonidin 3-O-glucosido
Pn-3rut	Peonidin 3-O-rutinosido
Pt-3ara	Petunidin 3-O-arabinosido
Pt-3gal	Petunidin 3-O-galactosido
Pt-3glu	Petunidin 3-O-glucosido
Sin	Ácido sinápico
Sir	Ácido siríngico
UHPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	Ultra Violeta Visible
Van	Ácido vanílico

